

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**Evaluación de la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. a la presencia
de metal Cadmio en aguas sintéticas**

AUTORA:

ISABEL DEL CARMEN MALDONADO RIVERA

TUTORA:

MARÍA FERNANDA GUEVARA

Quito, junio 2019

Cesión de derechos de autor

Yo Isabel del Carmen Maldonado Rivera con documento de identificación N° 1726529769 , manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. a la presencia de metal Cadmio en aguas sintéticas”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Isabel del Carmen Maldonado Rivera

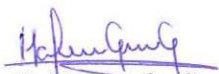
Cédula: 1726529769

Fecha: junio, 2019

Declaratoria de coautoría del docente tutora

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Evaluación de la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. a la presencia de metal Cadmio en aguas sintéticas” realizado por Isabel del Carmen Maldonado Rivera, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Junio 2019



María Fernanda Guevara

1002454948

Dedicatoria

A Dios como esencia de mi vida.

Con todo mi amor a Isabel Rivera, mi Madre, ejemplo y guía. Quien con su inmenso amor me ha formado como mujer y como profesional. Inculcándome valores, dándome su apoyo y cariño incondicional. Despertando en mi la inquietud de la indagación y el afán de conocimiento.

A mi hermano Patricio, el cual estimuló mi investigación y alentó mi proceso educativo en todo momento. Mi compañero excepcional de vida.

Agradecimientos

A mis padres por cultivar con entusiasmo el desarrollo personal que implica este logro académico.

A la Universidad Politécnica Salesiana por la formación académica plasmada en esta investigación.

Mi Gratitud y admiración para la Magister María Fernanda Guevara; quien me incentivó para realizar este trabajo de titulación que, con su sabiduría y conocimientos han trascendido para mi crecimiento personal y profesional.

A mis profesores Sabino Armenise y Janss Beltran que, con su tiempo y predisposición, me brindaron una valiosa asesoría con los resultados para este trabajo.

A mi futura colega y amiga Daniela Mena, por su colaboración en este proyecto, su paciencia, y entusiasmo en todo momento.

A la Ing. Carina Hidalgo y al grupo de investigación Nunkui Wakan por la contribución y asistencia en el laboratorio.

Índice

Introducción	1
Capítulo I	4
1. Marco conceptual	4
1.1. Cadmio.....	4
1.2 Metales pesados	5
1.3 Contaminación de cadmio y daños	6
1.4 Eliminación de metales pesados	7
1.5 <i>Chlorella</i>	9
1.6 Biorremediación de <i>Chlorella</i>	10
1.7 Pigmentos.....	11
1.8 Extracción de pigmentos.....	12
1.9 Potencial de oxidación – reducción y oxígeno disuelto.....	14
Capítulo II	16
2. Marco metodológico	16
2.1 Determinación de pigmentos liposolubles	17
2.2 Curva de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp.	18
2.3 Determinación de la concentración letal media (CL50)	19
Capítulo III	20
3. Resultados y discusión	20
3.1 Determinación de pigmentos liposolubles	20
3.2 Curva de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp.	30
3.3 Determinación de la concentración letal media (CL50)	33
Conclusiones	42
Recomendaciones	44
Bibliografía	45
Anexos	57

Índice de Tablas

Tabla 1. Resultados del porcentaje de mortalidad celular de <i>Chlorella</i> , correspondiente a pH 4.....	33
Tabla 2. Resultados del porcentaje de mortalidad celular de <i>Chlorella</i> correspondiente al pH 6	34
Tabla 3. Resultados del porcentaje de mortalidad celular de <i>Chlorella</i> , correspondiente al pH 8.	35
Tabla 4. Valores de la concentración letal media (CL50).....	35
Tabla 5. Valores de Potencial de oxidación-reducción	39
Tabla 6. Valores del Oxígeno Disuelto (DO).....	39

Índice de Figuras

Figura 1. Comparación de pigmentos liposolubles para pH 4.	23
Figura 2. Comparación de pigmentos liposolubles para pH 6.	24
Figura 3. Comparación de pigmentos liposolubles para pH 8	24
Figura 4. Cambio de color en la pastilla celular	26
Figura 5. Extrapolación de pigmentos para 10x6 cell/mL	29
Figura 6. Curva de Crecimiento de <i>Chlorella</i>	31
Figura 7. Concentración letal meda (CL50).....	37

Índice de Anexos

Anexo 1 Balones con <i>Chlorella</i>	57
Anexo 2 Montaje del ensayo.....	58
Anexo 3. Composición de las soluciones Buffer	58
Anexo 4 Análisis de varianza (ANOVA) para clorofila a	59
Anexo 5. Análisis de varianza (ANOVA) para clorofila b	60
Anexo 6. Análisis de varianza (ANOVA) para carotenoides	61
Anexo 7. Análisis Probit para pH 4	62
Anexo 8. Análisis Probit para pH 6	62
Anexo 9. Análisis Probit para pH 8.	63

Resumen

Diferentes fuentes de agua se encuentran contaminadas con metales, estos se bioacumulan ocasionando serios daños a la diversidad biológica. *Chlorella* tiene gran capacidad de retención de metales y ha sido utilizada en técnicas de biorremediación. El objetivo de este estudio es evaluar la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. a la presencia de cadmio; se compara la actividad fotosintética de la microalga expuesta a 6 distintas concentraciones de cadmio (Cd) y a diferentes valores de pH (4, 6, 8). Para estudiar el efecto del metal se evaluó el crecimiento mediante la cuantificación celular por cámara de Neubauer, cada 24 horas. Se comparó la actividad fotosintética de la microalga, por medio de la cuantificación de pigmentos liposolubles por métodos espectrofotométricos, mediante dos lecturas: una al inicio (0 horas) y otra al final (96 horas) del ensayo a las siguientes longitudes de onda: 662, 665 y 470 (nm). Finalmente, se determinó la concentración letal media (CL50) de cadmio sobre la microalga aplicando el análisis Probit. Así se determinó que los diferentes valores de pH son factores influyentes en la actividad de *Chlorella* sp., siendo pH 4 el más perjudicial y pH 6 y 8 favorecen el crecimiento y la actividad fotosintética; entre las concentraciones de metal no existe diferencia significativa pero la de 60 mg/L es la más influyente. El CL50 para pH 4 es 7.67 mg/L, para pH 6 es 80.66 mg/L y para pH 8 es 102.5 mg/L.

Palabras clave: *Chlorella* sp., cadmio, pigmentos liposolubles, crecimiento celular, CL50.

Abstract

Different sources of water are contaminated with metals, which bioaccumulate causing serious damage to biological diversity. *Chlorella* has a great ability to retain metal and has been used in bioremediation techniques. The objective of this study is to evaluate the physiological response of the microalga *Chlorella* sp. to the presence of cadmium, where the photosynthetic activity of the microalga exposed to 6 different concentrations of cadmium (Cd) and different pH values (4, 6, 8). In order to study the effect of metal, growth was evaluated by cell quantification and Neubauer chamber every 24 hours. The photosynthetic activity of the microalga was compared by means of the quantification of liposoluble pigments with spectrophotometric methods, by means of two readings: one at the beginning (0 hours) and another at the end (96 hours) of the test at the following wavelengths: 662, 665 and 470 (nm).

Finally, the median lethal concentration (LC50) of cadmium was determined on the microalgae by applying Probit analysis. Thus, it was determined that the different pH values are influential factors in the activity of *Chlorella* sp., pH 4 being the most harmful and pH 6 and 8 favor the growth and photosynthetic activity; between metal concentrations, there is no significant difference however 60 mg/L is the most influential. The LC50 for pH 4 is 7.67 mg/L, for pH 6 it is 80.66 mg/L and for pH 8 it is 102.5 mg/L.

Keywords: *Chlorella* sp., Cadmium, fat soluble pigments, cell growth, CL50.

Introducción

La contaminación del agua es un problema a nivel mundial, el cual se origina por vía directa a través de los desechos que genera el sector doméstico e industrial (Chuquitarco & Bolívar, 2017). Los metales pesados como el cadmio son significativas fuentes de contaminación del agua debido a que no son biodegradables por lo que persisten en el ambiente pudiendo acumularse en los diferentes niveles tróficos (Vega, 2017); así mismo, la Unión Europea, determinó que el cadmio está entre los once elementos principales, peligrosos y tóxicos para el medio ambiente y la salud de los humanos y animales (Cuizano & Navarro, 2008) como consecuencia que los ambientes acuáticos presenten concentraciones de metales que exceden los criterios de calidad de agua.

La eliminación del exceso de metales pesados como el cadmio del agua natural es, por lo tanto, muy importante. Los métodos tradicionales, como la precipitación química, el intercambio iónico, la adsorción y la ósmosis inversa son técnicas frecuentemente utilizadas para la eliminación de metales pesados, pero estos métodos tienen un uso limitado debido a restricciones técnicas y/o económicas (Cheng, Yin, Chang, Lundholm, & Jiang, 2017). Consecuentemente a partir de los años cuarenta iniciaron los estudios con microalgas como método para el tratamiento de aguas contaminadas, se utilizan estos sistemas para lograr la remoción de contaminantes y patógenos, ya que presentan la capacidad de acumular metales disueltos en estos sistemas acuosos; de esta manera se estableció que *Chlorella* sp. es un importante microorganismo biorremediador de efluentes industriales (Ramos, 2018). Además, las algas son organismos fotosintéticos responsables de la mayoría de la producción primaria en

ambientes acuáticos, desempeñando así un papel importante en las redes alimenticias acuáticas.

Chlorella ha demostrado tener una gran capacidad para tolerar y remover metales como cadmio (Pachay & Vicente, 2017), así lo demostraron Shen y otros, (2018) que al trabajar con *Chlorella* sp. para la biorremediación de este metal, lograron eliminarlo con una eficiencia del 92.45 %. De la misma forma los investigadores Cheng, Yin, Chang, Lundholm, & Jiang, (2017) obtuvieron una disminución en la concentración inicial del metal en un 95.2 % al aplicar *Chlorella vulgaris* en aguas contaminadas; con los ensayos presentados se observó que la microalga era un método eficiente para la ingeniería ambiental y para el mundo como tratamiento de aguas. La capacidad que posee la microalga para el proceso de biorremediación se debe a eficientes mecanismos bioacumuladores del metal, gracias a una mezcla de azúcares, glucosamina, proteínas y ácido úrico en su pared celular lo cual le permite atraer el metal en grandes cantidades por medio de la absorción y acumulación por la pared celular (Kaplan, 2007). De la misma manera Arunakumara (2007) enunció que la pared celular de las algas vivas son la estructura responsable de atrapar los metales, resultantes de la contaminación en aguas.

Las microalgas como *Chlorella* han demostrado que su respuesta celular depende principalmente del tipo, la actividad y la concentración del metal (Ilangoan, Cañizares-Villanueva, González Moreno, & Voltolina, 2008). El cadmio tiene un citotóxico influente en las algas verdes de agua dulce produciendo alteraciones estructurales específicas e inhibición de varias actividades de las microalgas (Ilangoan et al., 2008). Se ha demostrado por los autores Cheng, Yin, Chang,

Lundholm, & Jiang (2017) que el cadmio interrumpe la fotosíntesis, reducen la concentración de pigmentos y afectan la permeabilidad de la membrana plasmática en las microalgas; ya que este metal es adsorbido por las células de estas microalgas, ya que estas a comparación de organismos microbianos como levaduras y hongos, poseen la capacidad de adsorción más alta.

Al conocer que *Chlorella* tiene capacidad de biorremediar metales es importante determinar los efectos negativos que produce cadmio hacia la microalga, se debe tomar en cuenta esta información para el diseño de futuras plantas de tratamiento. Un factor importante es que este microorganismo es la base de la red trófica, por lo cual, cambios en estas microalgas pueden causar efectos en los eslabones de esta cadena debido a que varios seres vivos se alimentan de *Chlorella*. De este modo se provoca una alteración en el ecosistema y el ser humano al ser el consumidor final de esa cadena se ve afectado (Baraona, 2014). Por lo expuesto anteriormente el objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. a la presencia de cadmio en aguas sintéticas, por medio de varios ensayos; observando su actividad fotosintética expuesta a 6 distintas concentraciones del metal y a diferentes valores de pH por medio de la cuantificación de pigmentos liposolubles por métodos espectrofotométricos. Por otro lado, se busca analizar las curvas de crecimiento de *Chlorella* sp. en diversos ambientes de concentración de metal y pH mediante el conteo celular en cámara de Neubauer, además de valorar la concentración letal media (CL50) de cadmio sobre la microalga *Chlorella* sp. mediante pruebas toxicológicas aplicando el análisis Probit.

Capítulo I

1. Marco conceptual

1.1. Cadmio

Es un elemento natural, se encuentra a menudo en la naturaleza, es un metal con su símbolo atómico Cd, presenta un número atómico 48 y masa atómica de 112.40; la forma iónica de cadmio es Cd^{2+} (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008). El cadmio fue descubierto por el químico Friedrich Stromeyer en Alemania, en el año 1817, cuando analizaba la impureza del carbonato de zinc, por lo cual se consideró al cadmio como un subproducto (Madeddu, 2005).

Este metal se lo usa en algunos tipos de soldaduras, fusibles, en la fabricación de televisores a blanco y negro y en los de color también; se lo utiliza en la fabricación de baterías; por otro lado, sus sales se usan para obtener pigmentos de color amarillo, azul y verde como en el caso de las pinturas al óleo.

Es considerado uno de los agentes tóxicos más importantes ya que muestra como características que lo determinan su toxicidad como: que produce efectos adversos tanto para el ser humano como al medioambiente (al suelo y en al agua), se bioacumula en el ambiente y, posteriormente, se introduce en las cadenas alimentarias, no se biodegrada por lo que tiene una persistencia en el ambiente generando daños (International Encyclopedia of Public Health, 2017).

El cadmio (Cd) es uno de los principales contaminantes de los oligoelementos de los ecosistemas acuáticos (Almeida, Novelli, Dal Pai Silva, & Júnior, 2001). La entrada de cadmio a los ambientes acuáticos se provoca a través de desechos industriales y

descargas de aguas residuales, escorrentía y deposición atmosférica, por medio de estos procesos una vez en el medio acuático por su concentración de Cd^{2+} se introduce en la cadena alimenticia, resulta de su absorción y acumulación por el fitoplancton, los cuales a su vez son consumidos por los peces para distribuirse en su organismo y llegar por medio de la alimentación a animales superiores y al ser humano. Las concentraciones de Cd^{2+} en aguas contaminados oscilan entre 23 $\mu\text{g/L}$ y 1481 $\mu\text{g/L}$ (Audry, Schäfer, Blanc, & Jouanneau, 2011).

1.2 Metales pesados

Cualquier catión que tenga un peso atómico superior a 23, se considera un metal pesado; así, las aguas residuales contienen gran número de metales pesados diferentes. Entre ellos se puede destacar níquel, manganeso, plomo, cromo, cadmio, zinc, cobre, hierro y mercurio, entre otros (Utgikar et al., 2004).

Estos metales pesados tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas, por otro lado son considerados los contaminantes inorgánicos más importantes para el ambiente, ya que muchas veces a concentraciones bajas, estos metales pueden llegar a ser tóxicos (Li, Yang, Xu, Li, & Wang, 2018).

Los metales pesados se introducen en las plantas a través de la absorción de agua, que luego son absorbidos por los animales. La ingestión de estos productos a base de plantas y animales es la principal fuente de acumulación de metales pesados en los seres humanos, ya que apenas se metabolizan. Los metales pesados pueden contaminar las fuentes de agua (lagos, ríos, arroyos y aguas subterráneas) al lixiviar de los

desechos de los consumidores e industriales; la lluvia ácida intensifica este proceso al liberar metales pesados atrapados en el suelo (Kushwaha, Rani, Kumar, & Gautam, 2015).

1.3 Contaminación de cadmio y daños

Los principales problemas de salud ambiental que enfrentan tanto los países desarrollados y en desarrollo están relacionados con la falta de suministro de agua limpia e instalaciones adecuadas para la eliminación de aguas residuales. Muchos ecosistemas acuáticos están siendo progresivamente contaminados por descarga indiscriminada de metales tóxicos. Esta descarga surge como resultado de actividades humanas como la industria; la agricultura, la eliminación de residuos, como el metalizado, las operaciones mineras, los pesticidas, la industria textil, las industrias del papel y la fabricación de baterías, así como los procesos de mineralización de roca natural, entre otros; siendo un potencial contaminante para fuentes acuáticas y terrestres (Dala et al., 2018).

Los metales pesados son contaminantes extremadamente tóxicos, que se descargan directa o indirectamente en el agua natural de diferentes fuentes mencionadas anteriormente, lo que lleva a que metales como cadmio se bioacumulen (Cañizares, 2013). Se reconoce que el plomo y el cadmio son contaminantes muy peligrosos para diversos ecosistemas y para la salud humana, ya que se unen a los tejidos blandos y los huesos, lo que induce cambios complejos en las plantas a nivel genético, bioquímico y fisiológico y conduce a la fitotoxicidad. Para Cd la concentración tóxica que se conoce es de 0.03 mg/L (González, Trócoli, Pavlovic, Barriga, & La Mantia, 2016).

Este metal muestra una alta toxicidad en comparación con otros metales debido a su alta solubilidad en agua y una vida media biológica relativamente larga, además una amplia distribución en ecosistemas acuáticos al ingresar a los primeros eslabones de la cadena trófica, produciendo efectos dañinos para el ambiente, y por consecuencia para el ser humano (Du, Qiu, Pedrosa Gomes, Juneau, & Dai, 2019).

Los Autores Geng & Wang (2018); Nava-Ruíz & Méndez-Armenta (2011) coinciden que entre algunos de los efectos del metal cadmio sobre el medio ambiente son: mortalidad de los peces, envenenamiento de ganado, mortalidad de plancton, acumulaciones en el sedimento de peces y moluscos, entre otros; mientras que los efectos sobre el ser humano son: daño en varios los órganos y sistemas tales como: riñón, pulmón, hígado sistema gastrointestinal y hematopoyético, pero especialmente el sistema nervioso central y periférico, fuertes efectos teratogénicos y mutagénicos en los organismos vivos, entre otros. Este metal puede ser tóxico para las células vivas. La acumulación de metales puede causar daño bioquímico en organismos, reduciendo sus poblaciones y, afectando en conjunto al equilibrio del ecosistema.

1.4 Eliminación de metales pesados

Para la eliminación de metales pesados en fuentes acuáticas se ha tratado por métodos convencionales como la precipitación, oxidación, reducción, filtración, intercambio iónico, tratamiento electroquímico. En la actualidad se han implementado métodos a través de microorganismos que pueden ser bioacumuladores de metales siendo de gran ayuda para las técnicas convencionales (Kobielska, Howarth, Farha, & Nayak, 2018).

La toxicidad de los metales pesados presentes en las aguas residuales requiere la utilización de técnicas adecuadas para su eliminación por tal motivo se han incrementado las maneras de eliminar estos contaminantes, entre las más usadas y actuales existe otra forma de minimizarlos o eliminarlos mediante unos compuestos de estructura laminar llamados hidroatalcitas (hidróxidos dobles en capas, LDH) utilizados por los autores González et al. (2016) estos compuestos son conocidos también como hidróxidos dobles laminares o arcillas aniónicas ya que poseen la capacidad de electrodeposición es decir que, modifica los electrodos y favorecen la degradación de los metales pesados dado por la eliminación electroquímica de cationes contaminantes extremadamente tóxicos, como Cd (II) en agua contaminada, siendo significativo para el metal cadmio con una eliminación del 75 % , este método es selectivo pero costoso.

Por otro lado, el cultivo de microalgas de interés económico, puede ser utilizado para acuicultura y tratamiento de aguas residuales afectadas con metales pesados. Varios autores Romero et al.,(2002); Pérez, Abalde, Herrero, & Torres (2016), Folgar et al., (2009) y Mera, Torres, & Abalde (2014), utilizaron microalgas para el tratamiento de aguas con el fin de eliminar la contaminación provocada por los metales pesados, entre ellos el metal cadmio (Cd^{2+}), logrando el resultado esperado en cuanto a la reducción del metal gracias al metabolismo del alga.

Sin embargo, el cadmio es uno de los metales que afecta en el desarrollo y en el metabolismo de las microalgas, ya que produce desbalances metabólicos, inhibición del crecimiento, cambios morfológicos, y efectos adversos en la pared celular de las

microalgas como respuesta fisiológica a la exposición de este metal (Marchello, Oliveira, Lombardi, & Polpo, 2018).

1.5 *Chlorella*

Chlorella es una microalga unicelular que presenta una alta tasa de crecimiento en condiciones autótrofas y heterótrofas, perteneciente al orden *Chlorellales* y a la familia *Chlorellaceae* (Huang et al., 2009). Puede formar colonias de hasta 64 células. Su pared celular se encuentra compuesta por una mezcla compleja de azúcares, glucosamina, proteínas y ácido úrico (Rodas et al., 2013). Es capaz de incorporar grandes cantidades de metales (Cd^{+2} , $\text{Cr}^{+2,+3,+6}$, $\text{Fe}^{+2,+3}$, $\text{Cu}^{+1,+2}$, Zn^{+2} , $\text{Pb}^{+2,+4}$ y $\text{Hg}^{+1,+2}$) de esta manera la toxicología que generan los metales se disminuye evitando contaminación. (Jimeno, Mercado, Ballesteros, Yépez, & Vega, 2017), capacidad que se aprovecha en procesos de biorremediación, este fenómeno se da en de dos fases: intercambio independiente de la energía del ión metálico por los iones presentes en la pared celular y asimilación activa dependiente de la energía (Arunakumara, 2007).

Esta microalga es una especie indicadora importante para evaluar la toxicidad en ambientes acuáticos. Estudios previos de Huang, Tang, He, Gu, & Pan (2019) han mostrado cambios en las algas; en su morfología, niveles de clorofila y carotenoides, actividad enzimática y metabolismo cuando están en presencia de metales pesados contaminantes en agua.

1.6 Biorremediación de *Chlorella*

Se han desarrollado nuevas tecnologías para el tratamiento de efluentes contaminados con metales pesados, estos procesos deben ser menos agresivos para el medioambiente, evitando cambios en el ecosistema, por lo cual Costa & Leite (2014) después de realizar varios estudios determinaron que empleando microalgas como tratamiento cumple con este propósito. *Chlorella* es un microorganismo utilizado como biosorbente de metales pesados, como método alternativo para la reducción de contaminación en aguas residuales, puesto que en comparación con otros tratamientos de aguas, al trabajar con microalgas presenta una complejidad media y eficiente (Cañizares, 2013)

La biorremediación con *Chlorella* también se enfoca en los efectos potenciales de los compuestos tóxicos como los metales en el ambiente ya que se define por sus formas físico-químicas. En los sistemas de agua natural, los metales trazables pueden dividirse entre diferentes estados físicos, como los coloides libres o en forma de complejos, asociados con los coloides o con partículas. Se asume que los metales pesados al estar de forma libre y no unidos a partículas están directamente disponibles para los microorganismos y su acción biorremediadora.

En lo que respecta a los ensayos de toxicidad dados con microalgas son métodos útiles para estudiar la respuesta biológica con la especificación química del metal y del agua a tratar.

Además, al incrementar los problemas de contaminación ambiental se ha buscado alternativas para la eliminación de contaminantes en aguas residuales especialmente con microalgas, ya que, poseen la capacidad de biosorción de metales pesados y tolerancia a los mismos gracias a su pared celular, está rodeada de una red macromolecular tridimensional porosa; esta estructura de las microalgas presenta componentes importantes como: peptidoglucano, ácidos teicoicos, polisacáridos y proteínas, donde estas moléculas transportan los grupos cargados definiéndoles como polielectrolitos; esta propiedad de la pared celular les ofrece la propiedad de atracción electrostática y la complejación pueden jugar un papel con el metal (A. Hernández & Labbé, 2014)

Asimismo los autores Ramos & Pizarro (2018) mencionan que debido a que la pared celular de las algas está compuesta por una estructura de fibra y matriz de inclusión de varios polisacáridos puede retener metales en su estructura.

1.7 Pigmentos

Chlorella contiene pigmentos verdes llamados clorofila *a* y *b* que le ayudan a la fotosíntesis gracias a la cual se multiplica, estos pigmentos le otorgan el color verde característico (Otero, Cruz, & Velasco, 2015), los pigmentos se encuentran en el cloroplasto, donde realiza la fotosíntesis (Sansawa, Takahashi, Tsuchikura, & Endo, 2006).

Chlorella contiene los pigmentos verdes fotosintetizadores clorofila *a* y *b* en su cloroplasto. A través de la fotosíntesis se multiplica rápidamente, para su crecimiento requiere dióxido de carbono, agua, luz solar y mínimas cantidades de minerales (Silveira, Gómez, Kufundala, Salazar, & Ortega, 2018).

El contenido de clorofila *a* es utilizado para valorar en forma indirecta la biomasa o densidad celular de las microalgas, debido a que es el principal pigmento fotosintético presente en las mismas. La cantidad del pigmento clorofila *a* se utiliza en el estudio de sistemas acuáticos como embalses, cuencas hidrográficas, océanos y cursos de agua, como indicador del grado de contaminación (Baraona, 2014).

Tanto la clorofila *a* como la clorofila *b* tienen la función de absorber la luz, la captan y convierten esa energía en energía química (Tanaka & Tanaka, 2019).

Los carotenoides algales están presentes en las membranas tilacoidales de los cloroplastos o en el interior de cuerpos lipídicos, se encuentran en menor cantidad que las clorofilas y pertenece al 3.0-5.0 % p/p en peso seco (Dufossé et al., 2005). Los carotenoides, son pigmentos liposolubles isoprenoides, presentes en todos los organismos fotosintéticos, cuyo color va del amarillo al rojo (Cáceres, 2017).

En relación a la función de los carotenoides, éstos ayudan a mantener la integridad tridimensional de los complejos fotosintéticos dentro de las membranas tilacoidales, ya que ciertos carotenoides, como la luteína, se requieren para el adecuado ensamblaje de los complejos captadores de luz (Guerrero, Rodríguez, Vargas, & García, 2016).

1.8 Extracción de pigmentos

Los autores Caporgno, Haberkorn, Böcker, & Mathys (2019) y Kulkarni & Nikolov (2018) afirman que para la extracción de pigmentos fotosintéticos se usa algunos métodos entre la más usada es la recolección de las células de la microalga (células cultivadas) mediante centrifugación para una suspensión celular, para que el sedimento sea resuspendido en un compuesto químico ya sea metanol o acetona, reposando en

oscuridad y refrigeración con el fin de que el metanol o la acetona ayuden a la extracción de los pigmentos para posteriormente leer el sobrenadante en un espectrofotómetro a diferentes absorbancias.

Adicional a lo expuesto Kulkarni & Nikolov (2018), para lograr una extracción de pigmentos con buen rendimiento de clorofilas y carotenoides se lo realizó por triplicado, cada etapa repetía el mismo método de extracción.

Varios factores como la luz, el pH del cultivo, las disponibilidades de nutrientes influyen en la concentración de los pigmentos en *Chlorella* y el metabolismo algal

Para la cuantificación de pigmentos, clorofila a (Chl-a), clorofila b (Chl-b) y los carotenoides se calcularon usando las siguientes fórmulas:

Clorofitas:

$$\text{Clorofila } a \text{ (ug/mL)} = ((\text{DO}_{665} \times 15.65) - (\text{DO}_{652} \times 7.34)) \times \frac{VE}{VM}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (ug/mL)} = ((\text{DO}_{665} \times 15.65) - (\text{DO}_{665} \times 11.21)) \times \frac{VE}{VM}$$

$$\text{Carotenoides (ug/mL)} = (\text{DO}_{470} \times 4) \times \frac{VE}{VM}$$

Donde: VE = Volumen del extracto (Cantidad total de solvente utilizado) y,

VM = Volumen de muestra (Cantidad de cultivo utilizado)

Una vez realizada la lectura en el espectrofotómetro se aplica estas fórmulas utilizando las longitudes de onda aplicadas a las fórmulas para obtener un valor cuantificable de los pigmentos (Morales, 2018).

1.9 Potencial de oxidación – reducción y oxígeno disuelto

La manera de medir la energía química que será transformada en energía eléctrica, es por medio de un electrodo y se denomina potencial Redox. Este potencial de oxidación-reducción se considera positivo cuando se produce una oxidación y se acidifica el medio, y cuando se produce una reducción quiere decir que el medio se basifica y es negativo.

Para el potencial redox presenta una medida de la actividad del electrón para que se mantenga el valor constante, denominado ORP.

Por otro lado, el oxígeno disuelto (OD) es la cantidad de oxígeno disuelta en el agua, la forma en la que las moléculas de oxígeno están distribuidas en el agua, por medio de este valor se mide la capacidad del agua; mientras más alto es el valor del Oxígeno disuelto indica agua de mejor calidad, a comparación de niveles demasiado bajos donde el sistema biológico no puede vivir (Pulla, 2008). El oxígeno disuelto en agua es importante para el desarrollo de los organismos acuáticos, ya que ayuda a la respiración celular.

El oxígeno disuelto en aguas se ve influenciado por la actividad física, biológica y química del sistema, y la determinación de su concentración es un valor elemental para controlar el estado del agua en análisis, como un indicador de cuán contaminada está el agua (A. Hernández & Labbé, 2014). Por otro lado, la aireación de los medios, especialmente cuando es forzada, puede afectar la actividad del medio y la capacidad fotosintética, al incrementar el contenido de O_2 y de esta manera exceder los límites, convirtiéndose en un factor tóxico para el sistema (Carrasquero, Rincón, Díaz, & Pire, 2014).

El oxígeno disuelto (OD) al igual que los niveles de pH del agua son factores que se deben controlar regularidad ya que influyen en el crecimiento y desarrollo de la parte biológica del agua, densidad celular y alteran la disponibilidad de nutrientes (Christenson & Sims, 2011).

Capítulo II

2. Marco metodológico

Para el diseño experimental se establecieron tres ensayos en función de los diferentes pH (4, 6 y 8) en los cuales las condiciones controladas de luz, agitación y concentraciones de reactivos eran las mismas para el proceso de evaluación de la respuesta fisiológica de *Chlorella* sp.

En los ensayos se utilizó la microalga *Chlorella* sp. con una concentración celular inicial \approx de 30×10^6 células por mililitro, la cual fue obtenida mediante un conteo celular previo con cámara de Neubauer, el volumen de cultivo calculado se colocó en balones de base redonda (Anexo 1), en conjunto con 1.5 mL/L de fertilizante Nitrofoska, y solución de cadmio necesario, para lograr las diferentes concentraciones (3.75, 7.50, 15.00, 30.00 y 60.00 mg/L), luego se afora hasta llegar a un volumen del 250 mL con agua desionizada (obtenida de la purificadora marca Milipore modelo Direct-Q) por balón, además se trabajará con cultivos control (0 mg/L de Cd).

Estos ensayos se realizaron por triplicado. A continuación, se ajustó el pH a tres diferentes valores de 4, 6 y 8 con una solución Buffer específico para cada uno de los valores (Anexo 2). Dado que se trabajó por triplicado con 6 concentraciones de cadmio, se tiene un total de 18 balones por cada pH ensayado.

Los balones se los colocó en un diseño completamente azar (DCA), con condiciones controladas de luz artificial (12:12), 1847 lx (medido por el luxómetro MW700 Standard Portable Lux Meter) y, agitación manual tres veces al día, el ensayo tuvo una duración de 96 h. Cada día el pH se midió (valores obtenidos mediante el equipo

Mettler Toledo™ Medidor de pH de sobremesa FE20 FiveEasy™ de 4.54 kg) dos veces en cada repetición, una en la mañana y otra en la tarde, para verificar que el Buffer sea efectivo manteniéndose en el pH deseado; con el mismo equipo se midió el potencial de óxido-reducción (ORP), igualmente dos veces al día.

También dos veces al día se midió el O₂ disuelto (mediante el equipo Mettler Toledo™ SevenGo pro™ SG6 Dissolved Oxygen Meter).

2.1 Determinación de pigmentos liposolubles

La evaluación de la producción de pigmentos se determinó mediante lecturas en el espectrofotómetro (Espectrofotómetro de UV-visible Jasco V-730) con el cual se obtuvieron datos para determinar la cantidad de clorofila *a* y *b*, así como carotenoides, este control se lo realizó a las 0 horas y a las 96 horas, en el día inicial y el día final del ensayo.

El primer día (0 horas) de cada balón se tomaron dos muestras de 5mL del cultivo en dos tubos de vidrio, es decir de los 18 balones correspondientes al pH 4, se tomaron 36 tubos, mismos que se centrifugaron por 20 minutos a 331 RCFx g (1605 rpm) (por medio de la centrifuga Gemmy Industrial Group modelo PLC-05). Se descartó el sobrenadante con la ayuda de una pipeta Pasteur y a continuación se adicionaron 3mL de metanol, para evitar la fotooxidación se tapó el tubo con papel aluminio; las muestras se agitaron vigorosamente en vórtex, luego se sometieron a dos ciclos de sonicación en baño de hielo (en el equipo Fisherbrand FS60D Tabletop Ultrasonic Cleaner), por 5 minutos cada uno. Se dejaron las muestras en reposo a 4°C durante 72 horas para realizar la primera lectura.

Después de transcurridas las 72 horas en refrigeración, los tubos se sometieron a dos ciclos de sonicación en baño de hielo, por 5 minutos cada uno. Se centrifugó por 20 minutos a 331 RCFx g. Se separó el extracto de pigmentos (sobrenadante) con una micropipeta, registrando el volumen del extracto tomado, el cual se colocó en una celda de vidrio y posteriormente se realizó la lectura en el espectrofotómetro previamente calibrado con metanol a las longitudes 665 nm, 652 nm y 470 nm (Arredondo Vega & Voltolina, 2007).

Mientras tanto, en el tubo que contenía el pellet se adicionó 3 mL de metanol, se tapó con papel aluminio, se agitó en vórtex y se sónico en baño de hielo, por dos ciclos durante 5 minutos cada uno. Se volvió a dejar las muestras en reposo a 4°C durante 24 horas para realizar la segunda lectura. Al cabo de 24 horas se repitió el mismo procedimiento para leer las muestras en el espectrofotómetro y se volvió a dejar al pellet en reposo con metanol, siguiendo los pasos anteriores para sonicador, vórtex y refrigeración. El reposo en refrigeración para la última lectura es de 72 horas. Una vez transcurridas las 72 horas se leen las muestras en el espectrofotómetro por última vez.

La metodología descrita se repite con las muestras de cultivos de *Chlorella* sometidas a pH 4, pH 6 y pH 8, el primer día (0 horas) y último día del ensayo (96 horas).

2.2 Curva de crecimiento de *Chlorella* sp.

La exposición de la microalga al metal cadmio afectará en su desarrollo; por lo tanto, para evaluar esta variable se realizó la curva de crecimiento de la microalga *Chlorella* mediante el conteo celular en cámara de Neubauer cada 24 horas (Forero-Cujiño, Ruiz,

Pinilla-Agudelo, & Melgarejo-Muñoz, 2016). Para este proceso se tomó 1 mL de muestra de cada balón en un tubo Falcon, se adicionó 2 gotas de lugol para detener el crecimiento hasta realizar el conteo, posteriormente se colocó una gota de la muestra en la cámara de Neubauer con la ayuda de una pipeta Pasteur y se mira al microscopio para el respectivo conteo. Finalmente se repone 1mL de agua estéril a cada balón para reponer el volumen del cultivo tomado; y se tapa con Parafilm. Una vez obtenidos los valores de la concentración celular se realizó la curva desde las 0h hasta las 96 h.

2.3 Determinación de la concentración letal media (CL50)

Esta metodología busca establecer la concentración de cadmio en la cual la mitad de las células de *Chlorella* mueren, bajo condiciones controladas de intensidad lumínica y agitación. Una vez realizado el conteo en cámaras de Neubauer, durante el ciclo de 96 horas; se procedió a calcular el porcentaje de mortalidad de *Chlorella*; tomando en cuenta la concentración celular inicial y final, una vez expuesta a diferentes concentraciones de cadmio y diferentes pH (Cordero, Guevara, Morales, & Lodeiros, 2005). Para determinar la dosis letal media (DL50), se calculó por medio de la siguiente fórmula obtenida según los datos arrojados por el Infostat como constante y dosis ver en Anexo 6, 7 y 8, para cada pH (Balzarini, Gonzáles, Tablada, Casanoves, & Di Rienzo, 2008).

$$X50 = \frac{-\beta_0}{\beta_1}$$

Donde:

X50 corresponde: Dosis letal media

$-\beta_0$ corresponde = al valor de Est. de la constante

B1 corresponde = al valor de Est. de la dosis

Capítulo III

3. Resultados y discusión

3.1 Determinación de pigmentos liposolubles

Para la determinación de pigmentos liposolubles, correspondiente a clorofila a (ch *a*), clorofila b (ch *b*) y carotenoides (carot), una vez realizada la lectura a las 0 horas y a las 96 horas, con 3 lecturas del mismo pellet para el día inicial y final ya que los autores Kulkarni & Nikolov (2018) mencionan en su estudio que para mejor extracción de los pigmentos se debe leer tres veces la misma pastilla celular, de tal manera que se leyeron 3 veces la pastilla celular en este ensayo.

Por otro lado los resultados de la extracción de pigmentos van a depender del fotoperiodo y la exposición de los cultivos a la luz, ya que como nos indican las autoras Cabrera & Morera (2016) la luz es una fuente importante para el desarrollo de *Chlorella* y su actividad fotosintética, por lo cual las horas luz son necesarias para la producción de pigmentos, especialmente clorofila a ya que es el principal pigmento atrayente de energía y principal pigmento fotosintético, al transformar la energía en energía química para el metabolismo de la microalga.

Con los resultados obtenidos de la lectura en el espectrofotómetro previamente calibrado con metanol a las longitudes 665 nm, 652 nm y 470 nm (Arredondo Vega & Voltolina, 2007), se logró analizar la cantidad de clorofilas y carotenoides que se presentan en la siguiente gráfica valorada por cada nivel de pH (4, 6 y 8).

Los valores obtenidos de la medición de pigmentos liposolubles fueron realmente bajos para el valor de pH 4 (Figura1), es decir al comparar la cantidad de pigmentos a las 0 horas con la cantidad de pigmentos a las 96 horas existió una notable diferencia, y si se compara con la cantidad de pigmentos obtenidos a los valores de pH 6 (Figura

2) y pH 8 (Figura 3), donde se notó una mejor respuesta de *Chlorella*, de manera que los pigmentos incrementaron o reducían muy poco su concentración después de las 96 horas de exposición al metal; esto también se verificó por los autores Mallick & Rai, (2015) quienes en su experimento determinaron que para *Chlorella* la captación tanto de los nutrientes como de los metales para su actividad fotosintética, fue alta a pH 6 seguido de pH 7 y 8; y por otro lado para valores menores a pH 6 la captación de *Chlorella* disminuye; debido a que los pigmentos son fuentes primordiales para la actividad de la microalga, por lo que existió mayor captación de luz, es decir, hubo mayor cantidad de pigmentos especialmente clorofila *a* pH superior a 6.

En cultivos realizados bajo condiciones del laboratorio hay diferentes factores que influyen sobre la concentración de clorofila en la célula como: la composición del medio de cultivo, la edad de la célula, y algunas condiciones de operación, intensidad de iluminación y pH (Camacho, Martinez, & Sánchez, 2014) (Mallick & Rai, 2015). Los factores mencionados son importantes al momento de este ensayo; ya que, la composición del medio de cultivo estaba dado por la Nitrofoska la cual ofrecía los nutrientes necesarios para el crecimiento celular, las células eran viables, la intensidad lumínica se controló por el fotoperiodo por medio de luz artificial, y el pH fue uno de los factores a evaluar en este ensayo, para ello se realizó un análisis estadístico para la variable pH (ANOVA) dando como resultado que si existe diferencia significativa entre los valores de pH, esto nos indica que los diferentes niveles de pH influyen en la fisiología de la microalga *Chlorella* sp.

Clorofila *a*

El análisis de varianza nos indica que para el pigmento *ch a* existe diferencia significativa en pH, concentración de cadmio y en la interacción pH y concentración

de cadmio. Se muestra que el p-valor es menor a 0.05, y en la tabla se evidencia la diferencia entre los pH siendo mejor el pH 8 (equivalente al número 3 en la tabla del Infostat) (Anexo 4), en cuanto a las concentraciones la mejor sería 3.5 mg/L por lo que se analiza en este mismo estudio que las microalgas usan los metales como pequeños nutrientes al incorporarlos en su mecanismo con el fin de sobrevivir en el medio contaminado (Rojas & Alexis, 2017). Por otro lado el análisis de la interacción de las dos variables representa claramente que el medio con pH 4 es el que menos producción de clorofila *a* posee, a diferencia del pH 8 que es el que mayor producción tiene de clorofila *a* a las concentraciones más bajas es decir de 3.75, 7.50, 15.00 mg/L. (Abdel-Raouf, Al-Homaidan, & Ibraheem, 2012) (Valle, 2009).

Clorofila *b*

El resultado del análisis de varianza por Tuckey, indica que si hay diferencia significativa para el pH, y no existe diferencia significativa para concentración del metal y la interacción pH y concentración; tomando en cuenta que para clorofila *b* el mejor pH pertenece al valor de 6, como habíamos analizado la bibliografía nos indica que el pH óptimo para *Chlorella* va en el rango de 6-8 (Olortegui, 2015). En el Anexo 5 se puede observar el p-valor para el pH que es menor a 0.05 por lo que se afirma que hay diferencia entre los 3 valores de pH y para las otras dos variables no existe diferencia significativa, en este anexo también se puede observar que en el ANOVA muestra en la interacción de pH con la concentración del metal que el más influyente es el pH 4 equivalente al número 1 con la concentración de 60 mg/L de cadmio equivalente al número 6.

Carotenoides

Una vez realizado el ANOVA para analizar carotenoides, el programa Infostat 2008 nos indica que existe diferencia significativa en el pH al igual que los otros dos pigmentos, y también presenta diferencia significativa para concentración del metal ya que el p-valor para estos dos factores es ($p < 0.05$), siendo mejor el pH 8 seguido del pH 6 y por último el pH 4, siendo este último el que más les afecta en la producción de este pigmento, tomando en cuenta que al igual que clorofila *b* no existe diferencia para la interacción de pH y concentración; verificando que para carotenoides el mejor pH es el 8 (Ver en Anexo 6).

Comparación de pigmentos liposolubles para pH4

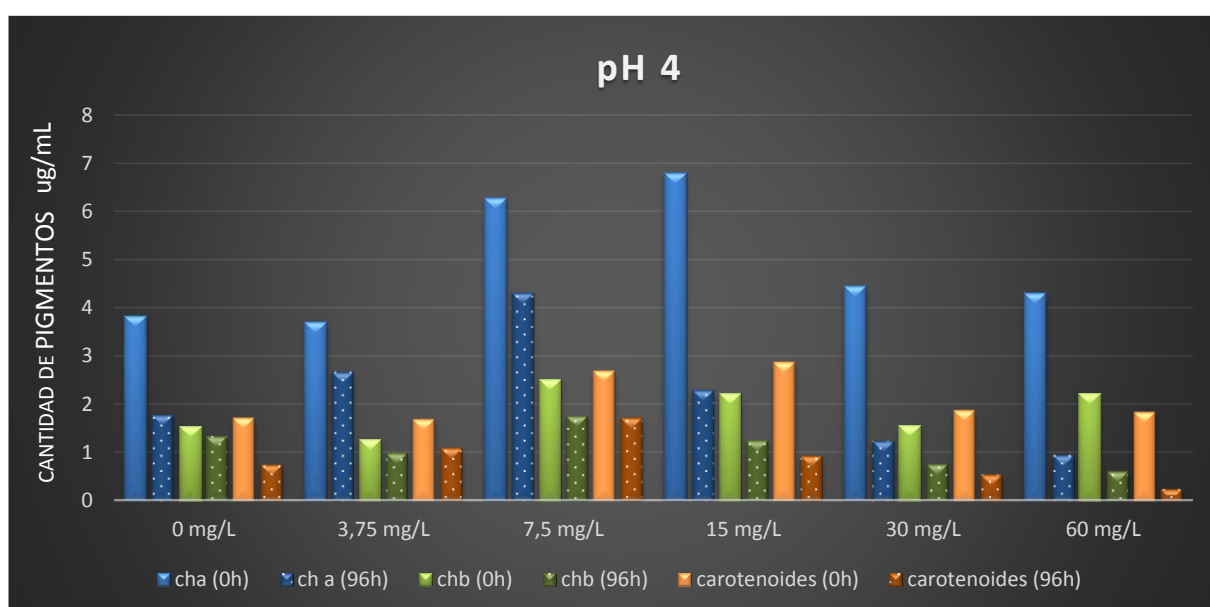


Figura 1. Cantidad de pigmentos ug/L correspondientes a ch *a* (clorofila a), ch *b* (clorofila b) y carotenoides; cada pigmento medido en el día inicial (0h) y el día final (96h), por cada concentración del metal cadmio.

Fuente: La Autora, 2018

Comparación de pigmentos liposolubles para pH6

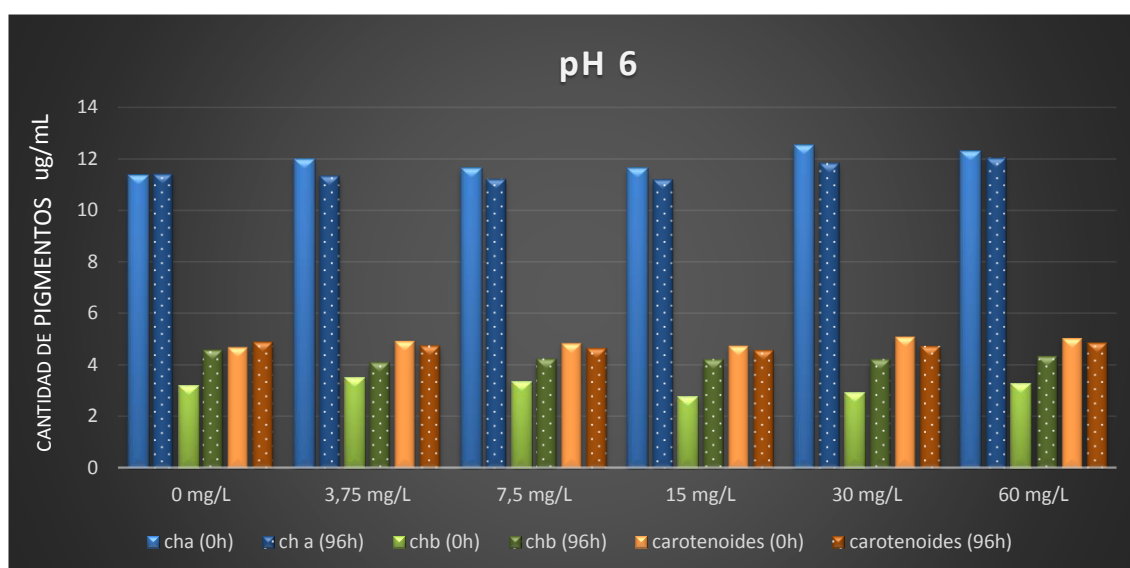


Figura 2. Cantidad de pigmentos ug/L correspondientes a ch a (clorofila a), ch b (clorofila b) y carotenoides; cada pigmento medido en el día inicial (0h) y el día final (96h), por cada concentración del metal cadmio.

Fuente: La Autora, 2018

Comparación de pigmentos liposolubles para pH8

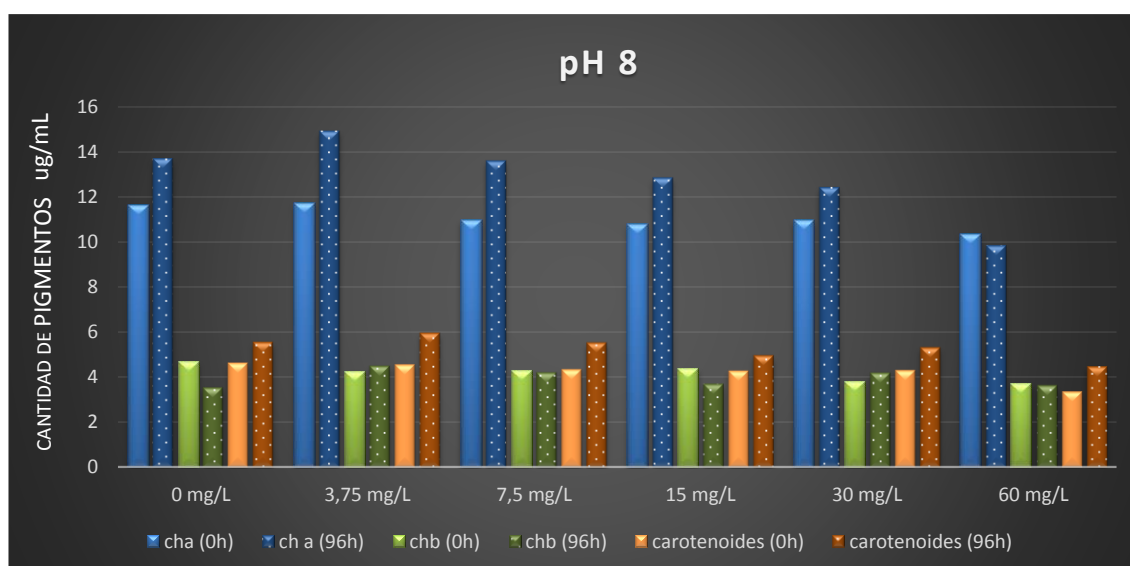


Figura 3. Cantidad de pigmentos ug/L correspondientes a ch a (clorofila a), ch b (clorofila b) y carotenoides; cada pigmento medido en el día inicial (0h) y el día final (96h), por cada concentración del metal cadmio.

Fuente: La Autora, 2018

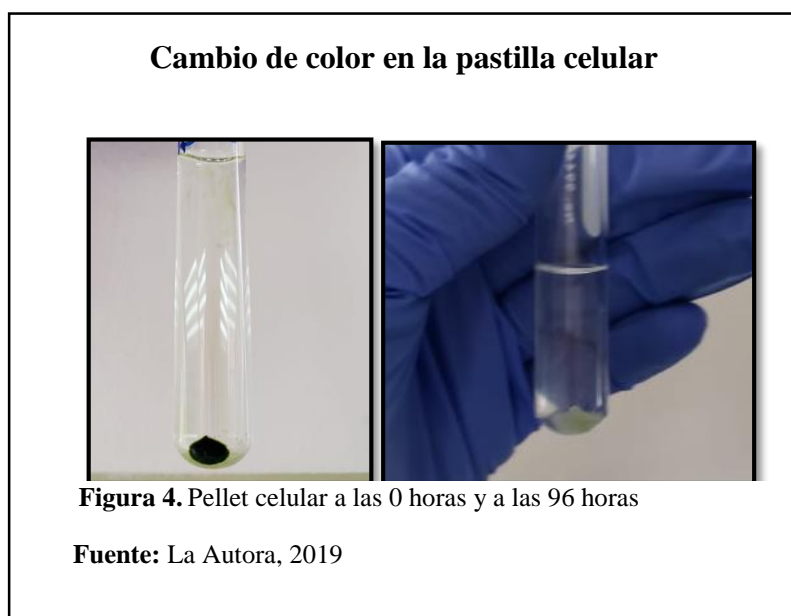
El medio donde se encuentran las microalgas debe proporcionar nutrientes necesarios para la fabricación de pigmentos, se debe agitar el cultivo para que el oxígeno disuelto ayude en el metabolismo del alga, el pH debe estar entre 6 y 9 para un crecimiento favorable y finalmente debe mantenerse un fotoperiodo de 12:12 (Otero et al., 2015); en el ensayo con Cadmio se mantuvo en cuenta estos parámetros con el fin de auxiliar a *Chlorella* en su metabolismo. *Chlorella* sp. al ser cultivada bajo irradiación con lámpara fluorescente (fotoperiodos de 12:12h) mostraron un mejor desarrollo y densidad celular. Sin embargo, la fotoinhibición del crecimiento celular se observó en las células bajo irradiación de lámpara fluorescente continua y exposición directa a la luz solar natural (ensayos realizados de manera previa al presente estudio), debido a esto se usaron lámparas para mantener la luz artificial ya que en ensayos anteriores con luz natural se pudo observar que *Chlorella* se volvió menos resistente y su mortalidad incrementaba de manera significativa; los pigmentos fotosintéticos de *Chlorella* sp. se identificaron como clorofilas y carotenoides, siendo los carotenoides los más afectados por la intensidad lumínica, lo cual puede ser un factor para que en el ensayo se vea una alteración en los valores de los carotenoides ya que estos principalmente cumplen el papel de ayudar a las clorofilas a la captación de luz por lo que en el ensayo al estar en oscuridad para evitar la fotooxidación las células trataron de producir mayor cantidad de carotenoides a diferencia de las clorofilas, basado en la revisión bibliográfica en los ensayos de los autores (Nurachman et al., 2015), (Molina, Cancino, & Montecino, 2016) (Garzón & Gonzalez, 2019).

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95 %, mediante el software estadístico Infostat versión 2008 (Balzarini, Gonzáles, Tablada, Casanoves, & Di Rienzo, 2008) para la cantidad de los tres pigmentos pertenecientes

a *Chlorella* sp. se confirmó que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los niveles de pH, los análisis estadísticos se realizaron a través de análisis de varianza y test Tukey, con el objetivo de examinar diferencias entre de cada tratamiento para niveles de pH, cantidad pigmentos y la interacción entre estos dos factores.

Zhou, Juneau, & Qiu (2009) indican que altas concentraciones de Cd y bajos niveles de pH del agua, afectan el contenido de pigmentos (clorofila a, carotenoides y ficobilinas) (Tovar Salamanca & Ruíz Díaz, 2016), en concordancia a esto se observa en nuestro análisis que a pH 4 (como indica en la figura 1) la cantidad de pigmentos es menor en este pH y a una concentración mayor de 60 mg/L.

Visualmente se podía observar el cambio de color en la pastilla celular, ya que en el día inicial (0 horas) su color era un verde oscuro por la cantidad de pigmentos encontrados en la célula; mientras que después de transcurridas las 96 horas con exposición a cadmio el pellet pierde su color verde característico volviéndose más claro, pálido, sin color por la pérdida de pigmentos, en la figura 4 se observa el pellet correspondiente a la concentración de 60 mg/L a un pH 4.



Los resultados obtenidos son coherentes con los encontrados en otros estudios citados en la literatura, en los cuales el contenido de clorofila *a* , *b* y carotenoides de *Chlorella* cultivada en medios sintéticos, se verificó que hubo diferencia significativa entre los cultivos referente al pH. Se esperaba que el contenido de clorofila en la microalga disminuya según la concentración del metal, pero en muchas ocasiones no fue de tal manera. Sin embargo, la tasa fotosintética no presentó una reducción significativa, a pesar que varía el contenido de pigmentos en los diferentes ensayos (Cleber, Sant' Anna, & Barcelos, 2011), lo cual se logró corroborar al momento de analizar las curva de crecimiento de la microalga.

Los puntos tratados anteriormente acerca de la cantidad de pigmentos liposolubles evaluados el primer día y el día final, se lograron comprobar mediante una extrapolación a 10×10^6 células por mililitro a las mismas concentraciones del metal cadmio (3.75, 7.50, 15.00, 30.00 y 60.00 mg/L), y los tres valores de pH 4, 6 y 8; donde se confirmó que el valor del pH es influyente sobre la actividad celular de *Chlorella*. Para ello en la figura 5 se muestran la diferencia en la cantidad de pigmentos por cada pH a las distintas concentraciones; en el pH4 se puede observar que todas las concentraciones de cadmio exceptuando el testigo (0 mg/L) acrecientan la cantidad de clorofila *a* debido a que este pigmento tiene la función de ser el principal captador de luz para la fotosíntesis de las células y por lo tanto la elaboración de pigmentos para que se lleve a cabo dicho proceso, y también exista la división celular adecuada, como se ve afectado el principal pigmento se observa que los pigmentos secundarios clorofila *b* y carotenoides incrementan su valor debido a que sirven de auxiliares para la clorofila *a* al momento de captar la luz y producir la energía química (Silveira et al., 2018).

Según el estudio realizado se consideró que los valores de pH 6 y pH 8 son los más apropiados y óptimos para el crecimiento celular y producción de pigmentos; esto se verificó en la extrapolación, en la figura 6, porque en el pH 6 y pH 8 se observa que el pigmento correspondiente a la clorofila *a* decrece en las concentraciones de 0.00 mg/L; 3.75 mg/L, 7.50 mg/L, debido a que con la anterior concentración celular la producción de pigmentos aumentó y en esta suposición con la nueva concentración celular los pigmentos bajan ya que el sistema fotosintético de *Chlorella* está funcionando correctamente, y una vez más se aprueba que el pH es un factor influyente importante para la respuesta fisiológica de la microalga y la concentración de una forma secundaria también afecta ya que a partir de los 15.00 mg/L los pigmentos aumentan debido a la necesidad fotosintética y la capacidad de la microalga para cumplir con la función de adsorción de cadmio; y, lo mismo ocurre con los pigmentos auxiliares que aumentan ya que la intención es ayudar a las funciones de la pared celular del microorganismo especialmente que los polisacáridos continúen captando el metal y a la clorofila *a* que continúe captando luz y transformando en energía química, evitando daños mayores y que continúe con su actividad celular (Romero et al., 2002).

Extrapolación de pigmentos para 10×10^6 cel/mL

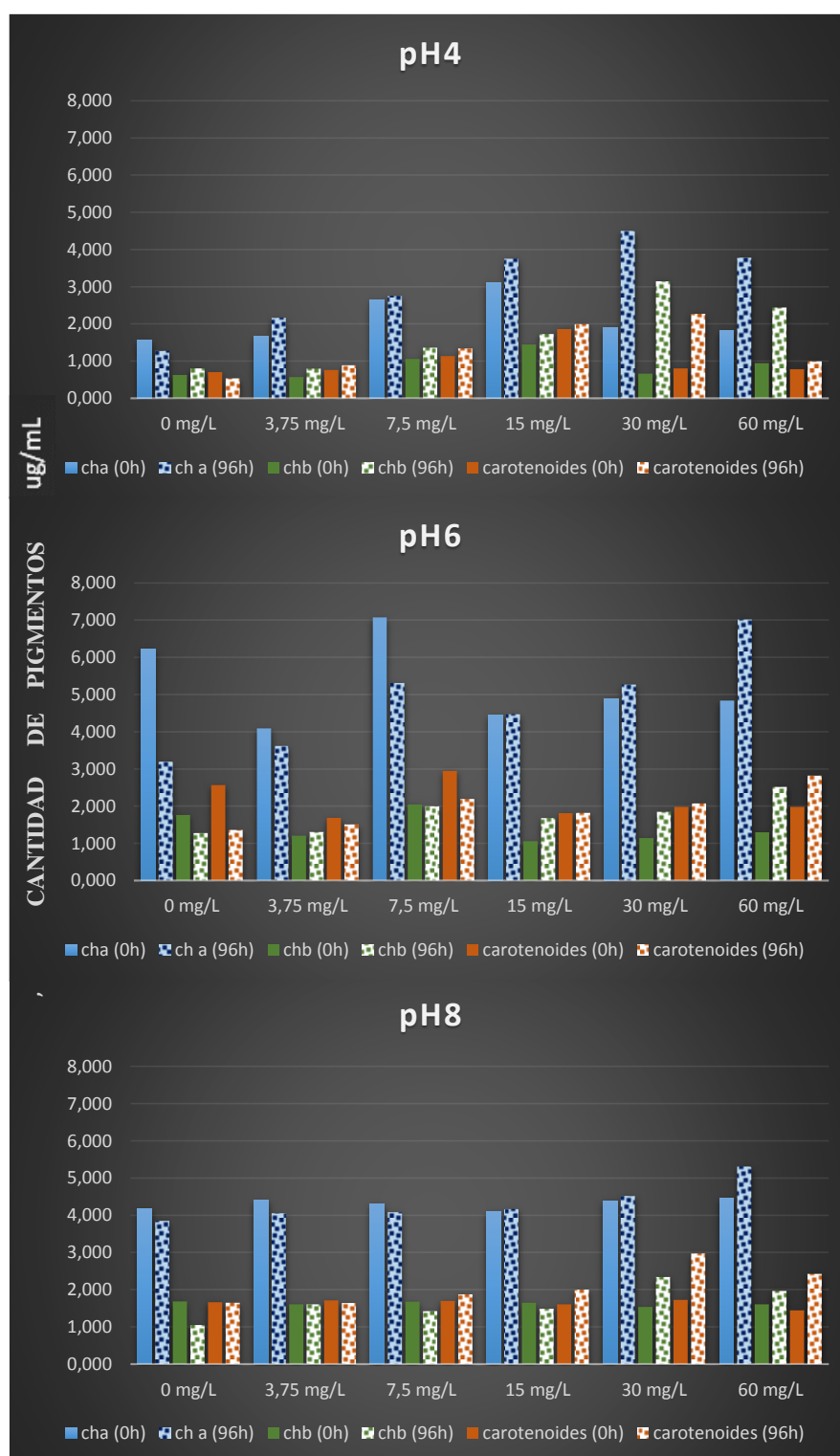


Figura 5. Extrapolación en la producción de pigmentos con una concentración celular de 10×10^6 cel/mL, cantidad de pigmentos en el día inicial (0 h) y en el día final (96h), a diferentes concentraciones de cadmio

Fuente: La Autora, 2019

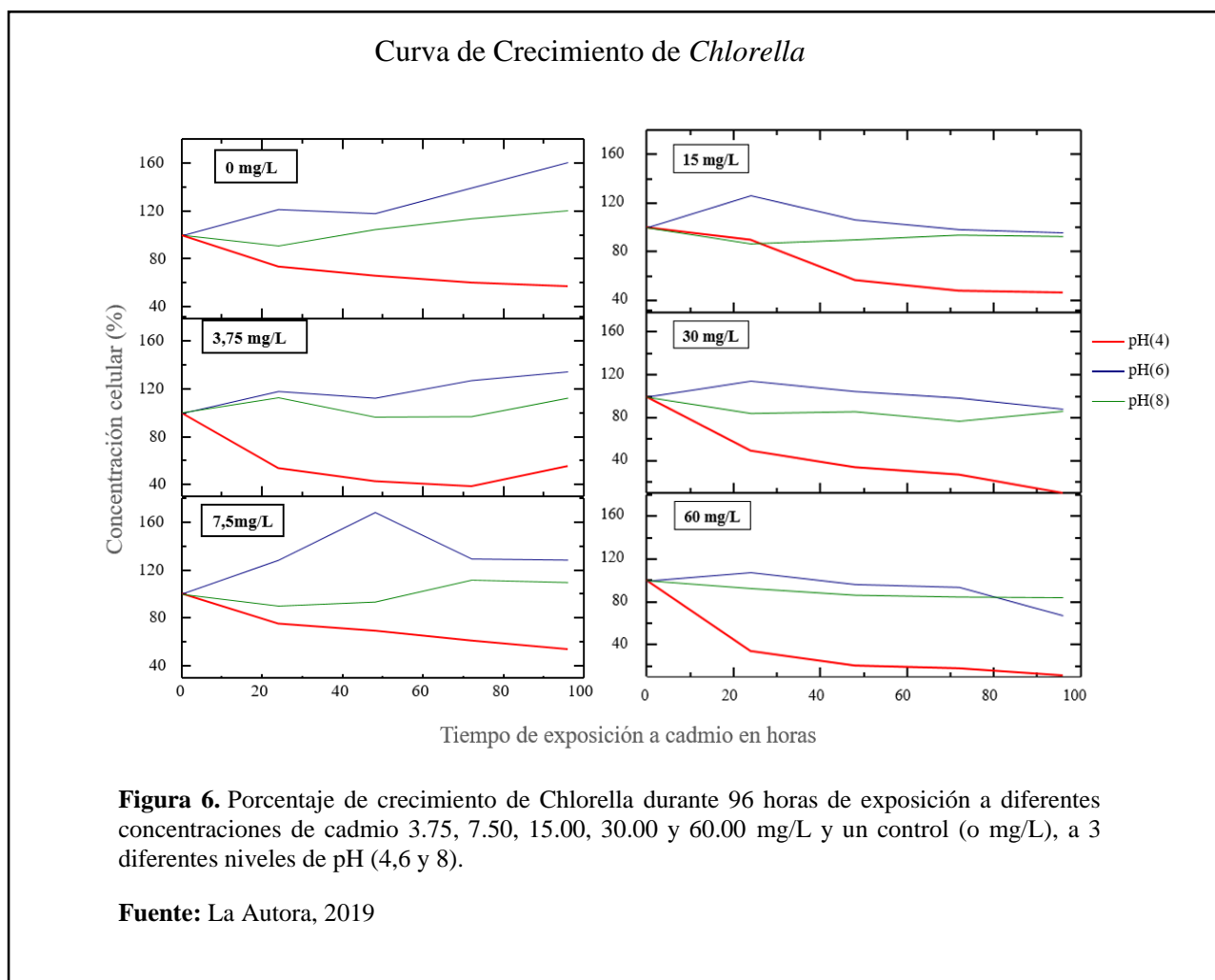
3.2 Curva de crecimiento de *Chlorella* sp.

Partiendo de cultivos con una concentración celular inicial de \approx de 30×10^6 células por mililitro, siendo esta concentración equivalente al 100 %; se analizó la cinética de crecimiento de la microalga, por cada valor de pH, y a las diferentes concentraciones del metal, es así que *Chlorella* muestra mejor respuesta en cuanto al crecimiento a pH 8 y pH 6, notando que la curva aumenta superando el 100 % a diferencia del pH 4 que se observó que la microalga tiene una mortalidad más rápida, verificando lo dicho por Moronta, Mora, & Morales (2006), en su trabajo de investigación que la microalga *Chlorella* es más sensible a pH menores a 5, y que, a pH 6, 7 y 8 *Chlorella* alcanza mayor crecimiento.

Para los autores Bulgariu & Bulgariu (2012) en su ensayo con microalgas, indican que el pH afecta el grado de disociación de los grupos funcionales de la superficie de la biomasa y la especiación y solubilidad de los iones metálicos que son los que atraen o captan el metal evitando que las concentraciones del mismo afecte el porcentaje de biosorción y desarrollo de los organismos vivos. El aumento del pH de la solución inicial dará lugar al aumento del número de interacciones electrostáticas; esto determinará el aumento de los valores de porcentaje de remoción, para todos los metales pesados estudiados por lo tanto aumentara la resistencia de la microalga en el medio (Ponte & Michel, 2019) .

Como se habló anteriormente la influencia del pH en la actividad fisiológica de *Chlorella* sp. es de gran importancia, y se ve afectada a niveles de pH menores a 6, como se puede observar en la figura 5, para el crecimiento o división celular es importante este factor ya que a pH4 se observa que el porcentaje de crecimiento disminuye desde el día inicial (0 h) al día final (96h) en todas las concentraciones. Por otro lado, la tasa de crecimiento de *Chlorella* sp. fue más alta en el control, mientras

que las concentraciones crecientes de Cd disminuyeron el crecimiento de la microalga, es decir, incrementando su porcentaje de mortalidad.



En consecuencia a esto varios metales presentes en aguas residuales llegan a ser fuente de nutrientes para las microalgas e incrementan la producción de clorofilas para su actividad fotosintética y desarrollo biológico y ciertas cantidades de ellos podría limitar el crecimiento de las algas como lo afirman los autores Prieto, González, Román, & Prieto García (2009) en su estudio donde afirman que en pH superior a 6 las microalgas adquieren la capacidad de captar el metal como nutriente a bajas concentraciones e incrementar su división celular mas no la producción de pigmentos en algunos casos como se verifico en nuestras curvas de crecimiento, y en pH inferior

a 6 las células comienzan a morir, intentando captar luz y realizar su división celular pero en la mayoría de las muestras decrece, comprobando en nuestro análisis donde en la curva correspondiente al pH 6 donde *Chlorella* adquiere la concentración de 7.5 mg/L de cadmio como nutriente momentáneamente e incrementa su concentración celular pero repentinamente se observa una decadencia de la curva de crecimiento, adicional a esto se comprueba la influencia de la interacción con el pH al ser 6 un valor óptimo de crecimiento para *Chlorella* las células crecen manteniendo un valor superior a la concentración celular inicial. Por otro lado los autores Cai, Park, & Li (2013) mencionan que dentro de las 48 horas de exposición al metal las microalgas pueden tomar estos metales como un nutriente adicional al colocado, como en nuestro caso la Nitrofoska es el nutriente que se colocó en el cultivo para mejorar su crecimiento, por esta razón en las curvas de crecimiento se pueden observar varios picos de crecimiento, donde las células de la microalga incrementan rápidamente su división y crecimiento celular; pero si las células no se encuentran a pH mayor a 6 y a bajas concentraciones del metal cadmio se observan los efectos sobre su crecimiento, dando como resultado la mortalidad.

Conjuntamente de lo antes mencionado factores ambientales, como la luz, afectan la toxicidad y la acumulación de Cd (Zeng & Wang, 2011) (Castillo, Rivera, Díaz, & Díaz, 2017); esto es un factor importante para este ensayo ya que se usó luz artificial por medio de lámparas fluorescentes para el ensayo como recomendación de los autores Gonzáles, Hernández, & Franco (2014), C. Hernández, Hernández, & Nava, (2014), Salazar, Monroy, Beristain, Cuevas, & Mendoza (2017) y mencionan que la luz necesaria óptima para microalgas es ≈ 1500 a 2500 lx por lo que al colocar las lámparas en nuestro modelo de ensayo nos daba una cantidad de luz aproximada de

1945 lx al día, 1893 lx al medio día y por la tarde 1703 lx, por lo que el promedio diario de grados lux es de 1847 lx valor que está dentro de los parámetros de luz óptima para el crecimiento, ya que la luz captada por los pigmentos (clorofilas y carotenoides) ayuda para que las células puedan realizar su fotosíntesis (Salazar et al., 2017).

3.3 Determinación de la concentración letal media (CL50)

Para la dosis letal media (DL50) se utilizó un análisis Probit evaluando los resultados experimentales del ensayo, correspondiente a las concentraciones del metal Cadmio frente al porcentaje de mortalidad celular de *Chlorella* obteniendo un número equivalente a la muerte del 50 % de las células en la curva de crecimiento.

Tabla 1. Resultados del porcentaje de mortalidad celular de *Chlorella*, correspondiente a pH4

pH4		
Dosis (mg/L de metal)	Expuestos	Muertos
3.75	100	44.193
7.5	100	45.965
15.0	100	53.274
30.0	100	89.610
60.0	100	89.213

Nota: Porcentaje obtenido a partir de la concentración celular final a las 96 horas de exposición a Cd, correspondiente al pH 4, donde Dosis son las concentraciones del metal (3.75, 7.50, 15.00, 30.00 y 60.00 mg/L), Expuestos es el porcentaje celular inicial del ensayo y Muertos es el porcentaje celular restante después de las 96 horas.
Fuente: La Autora, 2019

Por lo tanto para pH 4 el valor de la concentración letal media (CL50) es:

$$X_{50 \text{ pH } 4} = \frac{-0.23}{0.03}$$

$$X50 \text{ pH } 4 = 7.67 \text{ mg/L}$$

Tabla 2. Resultados del porcentaje de mortalidad celular de *Chlorella* correspondiente al pH 6

pH6		
Dosis (mg/L de metal)	Expuestos	Muertos
3.75	100	0.000
7.5	100	0.000
15.0	100	4.140
30.0	100	11.660
60.0	100	32.620

Nota: El porcentaje de muertos es equivalente a 0,000 debido a que existió crecimiento celular, es decir no existió mortalidad

Fuente: La Autora, 2019

Por lo tanto para pH 6 el valor de la concentración letal media (CL50) es:

$$X50 \text{ pH } 6 = \frac{-2.42}{0.03}$$

$$X50 \text{ pH } 6 = 80.66 \text{ mg/L}$$

Tabla 3. Resultados del porcentaje de mortalidad celular de *Chlorella*, correspondiente al pH8.

pH8		
dosis	Expuestos	Muertos
3.75	100	0.000
7.5	100	0.000
15.0	100	6.937
30.0	100	13.341
60.0	100	15.230

Nota: El porcentaje de muertos es equivalente a 0.000 debido a que existió crecimiento celular, es decir no existió mortalidad

Fuente: La Autora, 2019

Por lo tanto para pH 6 el valor de la concentración letal media (CL50) es:

$$X50 = \frac{-2.05}{0.02}$$

$$X50 = 102.5 \text{ mg/L}$$

CL50

Tabla 4. Valores de la concentración letal media (CL50)

Valor de pH	Concentración del metal Cadmio Cd (CL50)	% de Mortalidad de <i>Chlorella</i>
pH4	7.67 mg/L	50
pH6	80.66 mg/L	50
pH8	102.5 mg/L	50

Nota: El valor obtenido por medio del programa estadístico Infostat 2008 como CL50 significa que esa concentración del metal cadmio va a causar la muerte del 50 % de la concentración celular inicial.

Fuente: La Autora, 2019

Como se ya se ha demostrado en los ensayos realizados y en múltiples trabajos (Trick, Stuart, & Reeder, 2015), el pH es un factor influyente en los procesos biológicos como el crecimiento de ciertos organismos vivos como las microalgas, tal como se observó en el porcentaje de mortalidad de *Chlorella* viéndose afectada por el menor pH, ya que estos autores exponen que en niveles de pH menor a 6.5 la pared celular de las algas se ve afectada en su composición tanto a los peptidoglucano, polisacáridos y proteínas que son los que ayudan a la célula a realizar el intercambio iónico con el metal, por lo que éste al no ser tratado como biosorbente aborda al alga produciendo daños en su morfología o actividad fotosintética incrementando la mortalidad.

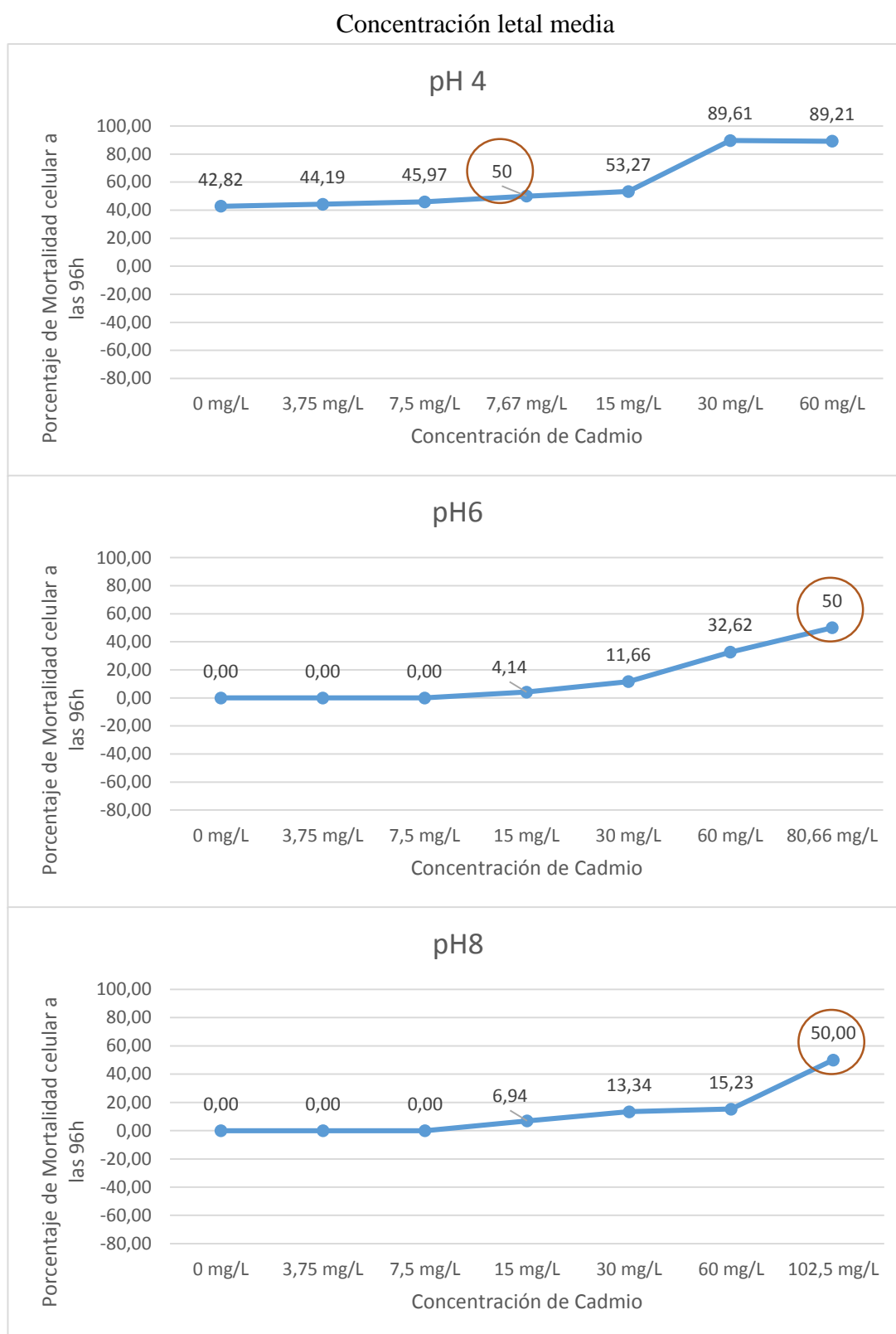


Figura 7. Se ilustra el porcentaje de mortalidad celular de *Chlorella* sp. expuesta a diferentes concentraciones del metal cadmio durante 96 horas; se señala el valor del CL50 para cada ensayo a diferente pH.

Fuente: La Autora, 2019

Sin embargo, el análisis Probit proporciona en general buenas estimaciones de CL50 cuando se obtiene la mortalidad, con el fin de conocer a que concentración exacta muere el 50 % de la población en estudio (Huerta, Chiffelle, Puga, Azúa, & Araya, 2010). El método permite determinar la proporción de la población que resultará afectada a consecuencia de factores externos. Consiste en asociar la probabilidad de un daño, con unas determinadas unidades Probit. El resultado es una curva como se puede observar en la Figura 6 donde se señala el valor necesario de cadmio para afectar a la mitad de la población inicial de *Chlorella* (Schumann & Tripathi, 2018). Además, relaciona el resultado de un análisis de la mortalidad arrojando una dosis específica influyente para la fisiología del microorganismo; el análisis Probit realizado con el porcentaje de mortalidad de *Chlorella* en relación con distintas concentraciones de Cd, donde se obtuvo el valor exacto para que la mitad de la población celular de *Chlorella* muera a los diferentes valores de pH (4, 6 y 8) (Ramadass, Megharaj, Venkateswarlu, & Naidu, 2017).

VALORES DE ORP Y OD

Tabla 5. Valores de Potencial de oxidación-reducción

Concentración de metal cadmio	Valores de pH		
	pH4	pH6	pH8
0 mg/L	151.41 mV	35.4 mV	-55.5 mV
3.75 mg/L	151.8 mV	38.5 mV	-59.5 mV
7.5 mg/L	152.2 mV	36.7 mV	-56.7 mV
15.0 mg/L	153.1 mV	37.2 mV	-68.2 mV
30.0 mg/L	153.8 mV	37.6 mV	-61.3 mV
60.0 mg/L	154.0 mV	40.8 mV	-60.4 mV

Nota: Los valores se midieron con el electrodo, dos veces al día, y la unidad de medida es mV (miliVoltios)

Fuente: La Autora, 2019

Tabla 6. Valores del Oxígeno Disuelto (DO)

Concentración de metal cadmio	Valores de pH		
	pH4	pH6	pH8
0 mg/L	0.485 mg/L	0.462 mg/L	0.267 mg/L
3.75 mg/L	0.601 mg/L	0.483 mg/L	0.298 mg/L
7.5 mg/L	0.672 mg/L	0.511 mg/L	0.302 mg/L
15.0 mg/L	0.720 mg/L	0.519 mg/L	0.336 mg/L
30.0 mg/L	0.730 mg/L	0.558 mg/L	0.405 mg/L
60.0 mg/L	0.739 mg/L	0.593 mg/L	0.432 mg/L

Nota: Los valores se midieron dos veces al día

Fuente: La Autora, 2019

Como resultado de la actividad de la microalga frente al metal cadmio se obtuvo dos factores a evaluar el Potencial de Oxidación-reducción y el Oxígeno disuelto, como se observan en las tablas 8 y 9. Por un lado el potencial de oxidación reducción es la cantidad de energía que pueden captar las células, y regularmente se ve influenciado por el nivel de pH, ya que a valores de pH menores a 5 esta cantidad de energía captada se ve influenciada (Godínez et al., 2004).

En consecuencia a esto los autores Lv et al., (2019) dicen que un ORP bajo, es decir valores negativos como se presentaron en el pH 8 en este ensayo, indicados en la tabla 8, muestra que las algas verdes como *Chlorella* están creciendo y su densidad celular está en aumento por lo que se capta mayor cantidad de energía química.

El potencial de oxidación-reducción al estar a un pH 4 los valores serían positivos por lo que el medio está ácido y los valores negativos están en un medio más alcalino como el pH 8, lo que indica que las células están haciendo su fotosíntesis y la captación de luz y energía está incrementando y su desarrollo está siendo óptimo (Otondo, Kokabian, Stuart-Dahl, & Gude, 2018).

Además al analizar el oxígeno disuelto se tomó en cuenta dos mediciones ya que como los autores Meichtry, Eugenio, Llano, & Mabel (2013), mencionan en su estudio con microalgas los niveles de DO pueden fluctuar durante el día, por ello se realizaron dos mediciones en el día para tener un estimado al final de las 96 horas; por la noche finaliza la fotosíntesis por parte de las células pro aun así continúan usando el oxígeno, causando una disminución del oxígeno disuelto, por ello hay que leer el valor del OD cada día durante las 96 horas del ensayo.

Como la población de algas está creciendo con gran rapidez, los niveles de oxígeno disuelto aumentan (Díaz, Ramírez Ayvar, Godínez Siordia, & Gallo García, 2006). Pero, la influencia de las concentraciones del metal cadmio y el pH producen la muerte celular, lo que requiere un incremento del oxígeno disuelto, como se puede observar en la tabla 9 el requerimiento de oxígeno es más alto para la concentración de Cd de 60 mg/L ya que a esta concentración hay mayor porcentaje de mortalidad, igualmente al comparar entre los valores del pH, se logra observar que a pH 4 el valor de OD es más alto al necesitar mayor cantidad por el daño que estos dos factores producen en el cultivo (Morla, 2016).

Conclusiones

En este estudio de la evaluación de la respuesta fisiológica de cadmio frente a *Chlorella*, se determinó que el factor del pH es influyente en el desarrollo de esta microalga, al igual que en la producción de pigmentos para su fotosíntesis; una vez realizado el análisis de varianza se obtuvo que, si existe diferencia significativa, siendo el nivel de pH4 el más influyente negativamente para *Chlorella*.

Por otro lado, las concentraciones de cadmio que se establecieron entre 0mg/L y 60 mg/L afectan a *Chlorella* en combinación con el pH, siendo las concentraciones más altas del metal las que más interfieren en su fisiología.

Se estableció que el pH óptimo para el desarrollo de *Chlorella* es el de pH 8 ya que la microalga se torna más resistente, la producción de pigmentos incrementa a pesar de la concentración de cadmio existente, sin embargo, el pH 6 es igualmente favorable ya que igual se observó un comportamiento resistente, la diferencia es que las células poseen una mortalidad más rápida que en el pH 8, pero se determinó que *Chlorella* posee mayor eficacia de un pH 6 a un pH 8.

La fisiología de la microalga *Chlorella* depende de varios factores como pH, luz, OD, ORP, concentración de metal; estos factores influenciaron en la fabricación de pigmentos liposolubles; tanto para clorofila a, clorofila b y carotenoides; ya que, estos pigmentos ayudan a las células a realizar la fotosíntesis y por lo tanto para que *Chlorella* pueda crecer, tomando en cuenta que a pH 6 el porcentaje de mortalidad a una concentración de 60 mg/L es 32.62 y a pH 8 a la misma concentración es 15.23.

Para este ensayo un factor importante a evaluar fue la determinación de la concentración letal media (CL50), ya que como se habló anteriormente, es el valor de la concentración de metal Cd necesaria para que el 50 % de las células mueran, gracias a este valor obtenido por el método Probit; se logra evaluar la capacidad de resistencia de *Chlorella* a cadmio ya que se evalúa la curva de crecimiento y el porcentaje de mortalidad, se obtuvieron los siguientes resultados; para pH 4 el valor de CL50 es de 7.67 mg/L, para el pH 6 el valor es 80.66 mg/L y finalmente para pH 8 el valor es 102.5 mg/L, en referencia a esto se observó que el pH influye nuevamente en el desarrollo biológico de *Chlorella* además que la concentración de Cd también influye ya que *Chlorella* lo puede tomar como nutriente dentro de las 48 horas de exposición o a su vez afecta este metal a la microalga, gracias al CL50 se estableció que se necesita mayor cantidad de metal a un pH 8 para que *Chlorella* se vea afectada y su crecimiento disminuya a diferencia del pH 4 que necesita una baja cantidad de Cadmio para que afecte a *Chlorella*.

Recomendaciones

Controlar constantemente de los parámetros como pH, OD, intensidad lumínica, debido a que estos influyen en la densidad celular y alteran la capacidad de las microalgas para remover nutrientes, y tratar de que la medición de estos parámetros sea a la misma hora cada día durante todo el ensayo.

Monitorear la intensidad de luz, porque tiene una gran importancia para el proceso de fotosíntesis, establecer el fotoperiodo ya que es vital para las microalgas.

Dejar reposar en refrigeración las muestras de *Chlorella* (pellet celular con metanol), las horas establecidas en la metodología ya que influyen en la extracción de pigmentos en el espectrofotómetro, al igual que las tres lecturas por cada repetición.

Usar los Buffer específicos para cada pH, ya que el valor del mismo debe mantenerse a lo largo de todo el ensayo por ello se realizan mediciones de pH diarias.

Ensayar con metales combinados sería la mejor opción a futuro ya que el agua residual contiene varios elementos tóxicos, y esto ayudaría a establecer las concentraciones de los metales y la respuesta de *Chlorella*.

Bibliografía

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257-275.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Arredondo Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Arunakumara, K. (2007). Comparative study on bioaccumulation of lead and cadmium by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under laboratory conditions. *Ciencias Marinas*, 33(3), 271-280.
<https://doi.org/10.7773/cm.v33i3.1199>
- Balzarini, M., Gonzáles, L., Tablada, M., Casanoves, F., & Di Rienzo, J. (2008). Infostat 2008. *Manual del Usuario*. Córdoba , Argentina: Brujas.
- Baraona, A. (2014). Determinación del potencial antimicrobiano de la microalga *Chlorella* extraída de las aguas empozadas de las aseQUIAS de Atocha . Ambato, Ecuador: Universidad Técnica de Ambato .
- Bower, V., & Bates, R. (1955). Res. Natl, Bur, Stand.
- Bulgariu, D., & Bulgariu, L. (2012). Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass. *Bioresource Technology*, 103(1), 489-493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.016>
- Cabrera, C., & Morera, V. (2016). Evaluación Comparativa de dos tipos de floculantes para la cosecha de biomasa de microalgas a escala piloto. Quito: Universidad de las Américas .

- Cáceres, S. O. C. (2017). *Aislamiento y caracterización de las principales microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante*. México.
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). *Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- Camacho, F., Martinez, M., & Sánchez, S. (2014). Contenido de clorofila en *Chlorella* durante el crecimiento heterotrófico. Granada.
- Cañizares, R. (2013). *Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana*. Recuperado de https://www.academia.edu/7446935/Biosorci%C3%B3n_de_metales_pesados_mediante_el_uso_de_biomasa_microbiana
- Caporgno, M. P., Haberkorn, I., Böcker, L., & Mathys, A. (2019). Cultivation of *Chlorella protothecoides* under different growth modes and its utilisation in oil/water emulsions. *Bioresource Technology*, 121476. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121476>
- Carrasquero, J., Rincón, N., Díaz, A., & Pire, C. (2014). Monitoreo de la remoción biológica de nitrógeno en efluentes de tenerías usando un reactor por carga secuencial. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 15(2), 287-298. [https://doi.org/10.1016/S1405-7743\(14\)72217-6](https://doi.org/10.1016/S1405-7743(14)72217-6)
- Castillo, C. M. N., Rivera, F. C. R., Díaz, L. E., & Díaz, A. G. L. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*, 15(28), 19-31. <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>

- Castro-González, M. I., & Méndez-Armenta, M. (2008). Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26(3), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.06.001>
- Cheng, J., Yin, W., Chang, Z., Lundholm, N., & Jiang, Z. (2017a). Biosorption capacity and kinetics of cadmium(II) on live and dead *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 211-221. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0916-2>
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6), 686-702. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>
- Cleber, F., Sant' Anna, E., & Barcelos, J. L. (2011). Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. *Ciência Rural*, 38(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=33138109>
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 325-330. Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-77442005000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Costa, A. C. A., & Leite, S. G. F. (2014). Metals biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorella homosphaera* cells. *Biotechnology Letters*, 13(8), 559-562. <https://doi.org/10.1007/BF01033409>
- Cuizano, N., & Navarro, A. (2008). Biosorción de metales pesados por algas marinas: Posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *Anales de la Real*

Sociedad Española de Química, ISSN 1575-3417, N°. 2, 2008, pags. 120-125, 104.

- Dala, B. M., Custódio, F. B., Knupp, E. A. N., Palmieri, H. E. L., Silva, J. B. B., & Glória, M. B. A. (2018). Cadmium, copper and lead levels in different cultivars of lettuce and soil from urban agriculture. *Environmental Pollution*, 242, 383-389. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.101>
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389-406. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>
- Folgar, S., Torres, E., Pérez-Rama, M., Cid, A., Herrero, C., & Abalde, J. (2009). *Dunaliella salina* as marine microalga highly tolerant to but a poor remover of cadmium. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1), 486-493. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.010>
- Forero-Cujiño, M. A., Ruiz, L. C. M., Pinilla-Agudelo, G. A., & Melgarejo-Muñoz, L. M. (2016). Inmovilización de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) y *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) en esferas de alginato de calcio. *Acta Biológica Colombiana*, 21(2), 437-442. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n2.51253>
- Garzón, A., & Gonzalez, J. D. (2019). Efecto de la intermitencia de la luz led sobre el crecimiento y producción de metabolitos de *Scenedesmus obliquus*. *reponame:Expedition Repositorio Institucional UJTL*. <http://hdl.handle.net/20.500.12010/5750>

- Geng, H.-X., & Wang, L. (2018). Cadmium: Toxic effects on placental and embryonic development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 67, 102-107.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.02.006>
- Godínez, D., Gallo, M. del C., Gelabert, R., Díaz, A., Gamboa, J., Landa, V., & Godínez, E. (2004). Crecimiento larvario de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) alimentada con dos especies de microalgas vivas. *Zootecnia Tropical*, 22(3), 265-276. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0798-72692004000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Gonzáles, C., Hernández, M., & Franco, M. (2014). Estimación de Iluminación en un Fotobiorreactor Productor de Biomasa a partir de microalgas . México : Colonia Urías .
- González, M. A., Trócoli, R., Pavlovic, I., Barriga, C., & La Mantia, F. (2016). Capturing Cd(II) and Pb(II) from contaminated water sources by electro-deposition on hydrotalcite-like compounds. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 18(3), 1838-1845. <https://doi.org/10.1039/c5cp05235a>
- Guerrero, M., Rodríguez, H., Vargas, M., & García, M. (2016). Las microalgas como productoras de pigmentos de interes comercial. *Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis*. Sevilla.
- Hernández, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
<https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hernández, C., Hernández, M. de J. S., & Nava, M. Á. F. (2014). Estimación de Iluminación en un Fotobiorreactor Productor de Biomasa a Partir de

- Microalgas. *ConCiencia Tecnológica*, (47), 29-35. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4749367>
- Huang, B., Tang, J., He, H., Gu, L., & Pan, X. (2019). Ecotoxicological effects and removal of 17 β -estradiol in *Chlorella* algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.129>
- Huerta, A., Chiffelle, I., Puga, K., Azúa, F., & Araya, J. E. (2010). Toxicity and repellence of aqueous and ethanolic extracts from *Schinus molle* on elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. *Crop Protection*, 29(10), 1118-1123. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.04.010>
- Ilangovan, K., Cañizares-Villanueva, R. O., González Moreno, S., & Voltolina, D. (2008). Effect of Cadmium and Zinc on Respiration and Photosynthesis in Suspended and Immobilized Cultures of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(6), 936-943. <https://doi.org/10.1007/s001289900718>
- International Encyclopedia of Public Health. (2017). Recuperado 8 de mayo de 2019, de <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780128037089/international-encyclopedia-of-public-health#book-description>
- Kaplan, D. (2007). Water Pollution and Bioremediation by Microalgae: Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. En *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 439-447). <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch26>
- Kobielska, P. A., Howarth, A. J., Farha, O. K., & Nayak, S. (2018). Metal–organic frameworks for heavy metal removal from water. *Coordination Chemistry Reviews*, 358, 92-107. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.12.010>

- Kulkarni, S., & Nikolov, Z. (2018). Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 35, 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.024>
- Kushwaha, A., Rani, R., Kumar, S., & Gautam, A. (2015). Heavy metal detoxification and tolerance mechanisms in plants: Implications for phytoremediation. *Environmental Reviews*, 24(1), 39-51. <https://doi.org/10.1139/er-2015-0010>
- Li, C., Yang, X., Xu, Y., Li, L., & Wang, Y. (2018). Cadmium detoxification induced by salt stress improves cadmium tolerance of multi-stress-tolerant *Pichia kudriavzevii*. *Environmental Pollution*, 242, 845-854. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.058>
- Lv, Y., Xiao, K., Yang, J., Zhu, Y., Pei, K., Yu, W., Hu, J. (2019). Correlation between oxidation-reduction potential values and sludge dewaterability during pre-oxidation. *Water Research*, 155, 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.049>
- Madeddu, R. (2005). *Estudio de la influencia del cadmio sobre el medioambiente y el organismo humano: perspectivas experimentales, epidemiológicas y morfofuncionales en el hombre y en los animales de experimentación: tesis doctoral*. Editorial de la Universidad de Granada, Granada.
- Marchello, A. E., Oliveira, N. L., Lombardi, A. T., & Polpo, A. (2018). An investigation onto Cd toxicity to freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* in mixotrophy and photoautotrophy: A Bayesian approach. *Chemosphere*, 211, 794-803. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.019>
- Meichtry, N., Eugenio, R., Llano, V., & Mabel, I. S. (2013). Fitoplancton del embalse Yacyretá (Argentina-Paraguay) a una década de su llenado. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(1), 225-239. <https://doi.org/10.7550/rmb.26831>

- Mera, R., Torres, E., & Abalde, J. (2014). Sulphate, more than a nutrient, protects the microalga *Chlamydomonas moewusii* from cadmium toxicity. *Aquatic Toxicology*, 148, 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.034>
- Molina, X., Cancino, J. M., & Montecino, V. (2016). *Cambios en los pigmentos fotosintetizadores de Gelidium rex (Rhodophyta) inducidos por el epibionte Membranipora tuberculata (Bryozoa)*. 9.
- Morales, E. (2018). Extracción y Cuantificación de pigmentos. *Escuela de Bioanálisis*. Ecuador.
- Moronta, R., Mora, R., & Morales¹, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 23(1), 28-43. Recuperado de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0378-78182006000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Nava-Ruíz, C., & Méndez-Armenta, M. (2011). *Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio)*. 8.
- Nurachman, Z., H, H., Rahmadiyah, W. R., Kurnia, D., Hidayat, R., Prijamboedi, B., ... Nurbaiti, S. (2015). Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. *Algal Research*, 10, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.009>
- Olortegui, R. (2015). microalgas verde ama'rillentas- dulce acuicola con potencial de remoción de cadmio. Perú.
- Otero, A., Cruz, P. E., & Velasco, Y. M. (2015). Evaluación del efecto del hidrocarburo fenantreno sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris* (*Chlorellaceae*). *Acta Biológica Colombiana*, 18(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=319028010006>

- Otondo, A., Kokabian, B., Stuart-Dahl, S., & Gude, V. G. (2018). Energetic evaluation of wastewater treatment using microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 3213-3222. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.064>
- Pachay, L., & Vicente, P. (2017). *Evaluación de la capacidad de remoción de cadmio in vitro utilizando la microalga Chlorella sp. y su potencial para la biorremediación de sitios naturales contaminados*. Recuperado de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/8068>
- Pérez, M., Abalde, J., Herrero, C., & Torres, E. (2016). Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*, 84(3), 265-270. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00045-7)
- Ponte, L., & Michel, W. (2019). Evaluacion de dos especies de microalgas para determinar la eficiencia de remocion de nutrientes de aguas residuales de la PTAR taboada del Callao, Peru. *Universidad Nacional Federico Villarreal*. Recuperado de <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/2705>
- Prieto, J., González, C. A., Román, A. D., & Prieto García, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=93911243003>
- Pulla, E. P. (2008). *Trabajo de investigación oxígeno disuelto (od)*. 6.
- Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2017). Toxicity of diesel water accommodated fraction toward microalgae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorella* sp. MM3. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 538-543. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.052>

- Ramos, R. (2018). Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 12.
- Rodas, H. A., Rodríguez, H., Flores, G., Vidales, J. A., Aranda, J., & Luna, A. I. (2013). Efecto de la densidad celular de inoculación en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* CLV2 cultivada bajo condiciones mixotróficas. *Revista fitotecnica mexicana*, 35(SPE5), 83-86. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0187-73802012000500016&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Rojas, P., & Alexis, Y. (2017). Efecto biorremediador de las clorofitas filamentosas en el tratamiento de aguas contaminadas por metales pesados provenientes del río Chillón-Callao. *Universidad Católica Sedes Sapientiae*. Recuperado de <http://repositorio.ucss.edu.pe/handle/UCSS/432>
- Romero, Y., Lodeiros, C., Esclapés, M., Marín, N., Guevara, M., & Morales, E. (2002). Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del nororiente de Venezuela. *Interciencia*, 27(3). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=33906602>
- Salazar, M., Monroy, O., Beristain, R., Cuevas, F., & Mendoza, C. (2017). *Influencia del medio de cultivo en el crecimiento de Haematococcus pluvialis*. 1.
- Sansawa, H., Takahashi, M., Tsuchikura, S., & Endo, H. (2006). Effect of *Chlorella* and its fractions on blood pressure, cerebral stroke lesions, and life-span in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(6), 457-466.

- Schumann, M., & Tripathi, G. (2018). Convexity of probit weights. *Statistics & Probability Letters*, 143, 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.spl.2018.07.022>
- Shen, Y., Zhu, W., Li, H., Ho, S.-H., Chen, J., Xie, Y., & Shi, X. (2018). Enhancing cadmium bioremediation by a complex of water-hyacinth derived pellets immobilized with *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 257, 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.060>
- Silveira, Y., Gómez, L., Kufundala, M. D., Salazar, D., & Ortega, Y. (2018). Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático. *Revista Cubana de Química*, 30(1), 55-67. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2224-54212018000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Tanaka, A., & Tanaka, R. (2019). The biochemistry, physiology, and evolution of the chlorophyll cycle. En *Advances in Botanical Research*. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.03.005>
- Tovar Salamanca, J. C., & Ruíz Díaz, J. P. (2016). *Propuesta de escalamiento de un fotobiorreactor para la microalga Chlorella vulgaris a nivel piloto*. Recuperado de <http://repository.uamerica.edu.co>
- Trick, J., Stuart, M., & Reeder, S. (2015). *Contaminated groundwater sampling and quality control of water analyses*.
- Utgikar, V. P., Chaudhary, N., Koeniger, A., Tabak, H. H., Haines, J. R., & Govind, R. (2004). Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Research*, 38(17), 3651-3658. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.05.022>

- Valle, G. (2009). Utilización de microalgas para la remoción de cadmio . Baja California , México.
- Vega, M. S. (2017). *Metallic nanoparticles (tio2, ceo2 and ag): behaviour, bioavailability, ecotoxicity and bioaccumulation in freshwater and marine organisms* (Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad de Cádiz). Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=110207>
- Zeng, J., & Wang, W. X. (2011). Temperature and irradiance influences on cadmium and zinc uptake and toxicity in a freshwater cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1-3), 922-929. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.009>
- Zhou, W., Juneau, P., & Qiu, B. (2009). Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium. *Chemosphere*, 65(10), 1738-1746. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.078>

Anexos

Anexo 1 Balones con *Chlorella*



Nota: Cada balón está etiquetado de acuerdo a la concentración del metal, intensidad lumínica controlada.

Fuente: La Autora, 2018

Anexo 2 Montaje del ensayo



Nota: balones a diferentes concentraciones de metal ubicados en un ensayo DCA.

Fuente: La Autora, 2018

Anexo 3. Composición de las soluciones Buffer

➤ Solución Buffer pH4

50 mL de 0.1 M Hidrogenoftalato de potasio + 0.1 mL de 0.1 M Ácido Clorhídrico

➤ Solución Buffer pH6

50 mL 0,1M Fosfato monopotásico + 5,6 mL 0.1M Hidróxido de Sodio

➤ Solución Buffer pH8

50 mL de 0.025M bórax + 20.5 mL de 0.1M Ácido Clorhídrico

Nota: Solución Buffer aforada a 100mL

Fuente: Bower & Bates, (1955)

Anexo 4 Análisis de varianza (ANOVA) para clorofila a

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
cha	54	0,94	0,91	153,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	229,56	17	13,50	31,79	<0,0001
pH	180,70	2	90,35	212,68	<0,0001
ppm	24,25	5	4,85	11,41	<0,0001
pH*ppm	24,61	10	2,46	5,79	<0,0001
Error	15,29	36	0,42		
Total	244,85	53			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,53105

Error: 0,4248 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.
3,00	-1,81	18	0,15 A
2,00	0,40	18	0,15 B
1,00	2,67	18	0,15 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,92440

Error: 0,4248 gl: 36

ppm	Medias	n	E.E.
2,00	-0,51	9	0,22 A
3,00	-0,09	9	0,22 A B
1,00	-0,02	9	0,22 A B
5,00	0,82	9	0,22 B C
4,00	0,96	9	0,22 C
6,00	1,38	9	0,22 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,99587

Error: 0,4248 gl: 36

pH	ppm	Medias	n	E.E.
3,00	2,00	-3,19	3	0,38 A
3,00	3,00	-2,64	3	0,38 A
3,00	1,00	-2,06	3	0,38 A
3,00	4,00	-2,04	3	0,38 A
3,00	5,00	-1,43	3	0,38 A B
2,00	1,00	-0,03	3	0,38 B C
2,00	6,00	0,28	3	0,38 B C D
2,00	3,00	0,42	3	0,38 B C D
2,00	4,00	0,43	3	0,38 B C D
3,00	6,00	0,51	3	0,38 B C D
2,00	2,00	0,63	3	0,38 C D
2,00	5,00	0,70	3	0,38 C D
1,00	2,00	1,02	3	0,38 C D
1,00	3,00	1,96	3	0,38 C D E
1,00	1,00	2,04	3	0,38 D E
1,00	5,00	3,19	3	0,38 E F
1,00	6,00	3,34	3	0,38 E F
1,00	4,00	4,50	3	0,38 F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Nota: El ANOVA se realizó por medio de programa estadístico Infostat 2008 para clorofila *a* diferentes concentraciones de cadmio y diferentes valores de pH. Existe diferencia significativa para las tres variables

Fuente: La Autora, 2019

Anexo 5. Análisis de varianza (ANOVA) para clorofila b

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
chb	54	0,71	0,57	1477,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	47,14	17	2,77	5,19	<0,0001
pH	38,72	2	19,36	36,27	<0,0001
ppm	1,36	5	0,27	0,51	0,7660
pH*ppm	7,05	10	0,70	1,32	0,2572
Error	19,22	36	0,53		
Total	66,36	53			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,59534

Error: 0,5339 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.	
2,00	-1,08	18	0,17	A
3,00	0,26	18	0,17	B
1,00	0,97	18	0,17	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,03631

Error: 0,5339 gl: 36

ppm	Medias	n	E.E.	
5,00	-0,27	9	0,24	A
3,00	0,01	9	0,24	A
4,00	0,08	9	0,24	A
2,00	0,09	9	0,24	A
1,00	0,15	9	0,24	A
6,00	0,23	9	0,24	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,23749

Error: 0,5339 gl: 36

pH	ppm	Medias	n	E.E.	
2,00	4,00	-1,44	3	0,42	A
2,00	1,00	-1,34	3	0,42	A
2,00	5,00	-1,25	3	0,42	A B
2,00	6,00	-1,02	3	0,42	A B C
2,00	3,00	-0,85	3	0,42	A B C
2,00	2,00	-0,56	3	0,42	A B C D
3,00	5,00	-0,35	3	0,42	A B C D
3,00	2,00	-0,19	3	0,42	A B C D
3,00	3,00	0,11	3	0,42	A B C D
3,00	6,00	0,11	3	0,42	A B C D
1,00	1,00	0,63	3	0,42	A B C D
3,00	4,00	0,70	3	0,42	A B C D
1,00	3,00	0,77	3	0,42	A B C D
1,00	5,00	0,78	3	0,42	A B C D
1,00	4,00	0,98	3	0,42	B C D
1,00	2,00	1,03	3	0,42	C D
3,00	1,00	1,17	3	0,42	C D
1,00	6,00	1,60	3	0,42	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Nota: El ANOVA se realizó por medio de programa estadístico Infostat 2008 para clorofila *b* diferentes concentraciones de cadmio y diferentes valores de pH. Existe diferencia significativa solo para la variable de pH

Fuente: La Autora, 2019

Anexo 6. Análisis de varianza (ANOVA) para carotenoides

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
carot	54	0,89	0,83	365,95

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	51,44	17	3,03	16,55	<0,0001
pH	46,51	2	23,26	127,18	<0,0001
ppm	2,68	5	0,54	2,93	0,0255
pH*ppm	2,25	10	0,23	1,23	0,3053
Error	6,58	36	0,18		
Total	58,03	53			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,34841

Error: 0,1829 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.	
3,00	-1,04	18	0,10	A
2,00	0,17	18	0,10	B
1,00	1,23	18	0,10	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,60648

Error: 0,1829 gl: 36

ppm	Medias	n	E.E.	
2,00	-0,20	9	0,14	A
1,00	-0,04	9	0,14	A B
3,00	-2,0E-04	9	0,14	A B
6,00	0,23	9	0,14	A B
5,00	0,24	9	0,14	A B
4,00	0,48	9	0,14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,30944

Error: 0,1829 gl: 36

pH	ppm	Medias	n	E.E.	
3,00	2,00	-1,39	3	0,25	A
3,00	3,00	-1,18	3	0,25	A
3,00	6,00	-1,10	3	0,25	A B
3,00	5,00	-1,01	3	0,25	A B
3,00	1,00	-0,91	3	0,25	A B C
3,00	4,00	-0,68	3	0,25	A B C D
2,00	1,00	-0,18	3	0,25	A B C D E
2,00	4,00	0,19	3	0,25	B C D E F
2,00	6,00	0,19	3	0,25	B C D E F
2,00	2,00	0,20	3	0,25	B C D E F
2,00	3,00	0,21	3	0,25	B C D E F
2,00	5,00	0,39	3	0,25	C D E F G
1,00	2,00	0,59	3	0,25	D E F G
1,00	1,00	0,97	3	0,25	E F G H
1,00	3,00	0,97	3	0,25	E F G H
1,00	5,00	1,32	3	0,25	F G H
1,00	6,00	1,58	3	0,25	G H
1,00	4,00	1,93	3	0,25	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Nota: El ANOVA se realizó por medio de programa estadístico Infostat 2008 para carotenoides a diferentes concentraciones de cadmio y diferentes valores de pH. Existe diferencia significativa para la variable de pH y ppm (concentraciones de cadmio).

Fuente: La Autora, 2019

Anexo 7. Análisis Probit para pH 4

Parámetros	Est.	E.E.	Wald LI(95%)	Wald LS(95%)	Wald Chi²	p-valor
Constante	-0,23	0,09	-0,41	-0,06	6,67	0,0098
dosis	0,03	3,7E-03	0,02	0,04	64,25	<0,0001

	Valor	gl
Log Likelihood	-283,96	498
Deviance	19,34	498
Escala (fijada)	1,00	

Pruebas de hipótesis marginales

F.V.	gl	-2[L0-L1]	p-valor
dosis	1	82,87	<0,0001

Nota: Cálculos para determinar el CI50 de *Chlorella* sp. por medio del programa estadístico Infostat 2008; los dos valores señalados por el cuadro amarillo son los que se usan en la fórmula.

Fuente: La Autora, 2019

Anexo 8. Análisis Probit para pH 6

Parámetros	Est.	E.E.	Wald LI(95%)	Wald LS(95%)	Wald Chi²	p-valor
Constante	-2,42	0,19	-2,79	-2,05	165,15	<0,0001
dosis	0,03	4,2E-03	0,03	0,04	65,49	<0,0001

	Valor	gl
Log Likelihood	-120,22	498
Deviance	7,66	498
Escala (fijada)	1,00	

Pruebas de hipótesis marginales

F.V.	gl	-2[L0-L1]	p-valor
dosis	1	77,64	<0,0001

Nota: Cálculos para determinar el CI50 de *Chlorella* sp. por medio del programa estadístico Infostat 2008; los dos valores señalados por el cuadro amarillo son los que se usan en la fórmula.

Fuente: La Autora, 2019

Anexo 9. Análisis Probit para pH 8.

Parámetros	Est.	E.E.	Wald LI(95%)	Wald LS(95%)	Wald Chi²	p-valor
Constante	-2,05	0,16	-2,36	-1,73	161,94	<0,0001
dosis	0.02	4,0E-03	0,01	0,03	24,14	<0,0001

	Valor	gl
Log Likelihood	-116,26	498
Deviance	18,22	498
Escala (fijada)	1,00	

Pruebas de hipótesis marginales

F.V.	gl	-2[L0-L1]	p-valor
dosis	1	23,73	<0,0001

Nota: Cálculos para determinar el CI50 de *Chlorella* sp. por medio del programa estadístico Infostat 2008; los dos valores señalados por el cuadro amarillo son los que se usan en la fórmula.

Fuente: La Autora, 2019